



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD IRAPUATO**

Degradación de hidrocarburos en suelo contaminado con petróleo mediante la bioestimulación de bacterias nativas hidrocarbonoclastas y productoras de biosurfactantes

Tesis que presenta

**IBT. Mónica Liliana Rodríguez Uribe**

Para Obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de

**Biotecnología de Plantas**

Director de Tesis

**Dr. Juan José Peña Cabriaes**

**Irapuato, Guanajuato**

**Enero de 2017**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Juan José Peña Cabriales.

## DEDICATORIA

A mi **NONO PEDRO** que se fue a descansar convencido de que a la distancia mi corazón encontraba en su existencia una motivación para salir adelante y despertar cada día con la ilusión de regresar y volvernos a encontrar.

Por haber sido la roca firme sobre la cual se ha edificado esta grande y hermosa familia.

Por el legado de fuerza y arranque que hoy me han impulsado a seguir adelante.

✚Pedro Pablo Rodríguez

29-06-1925/17-01-2017

A mi **NONA ANA** por haber sido el ejemplo perfecto de mujer valiente, luchadora y trabajadora.

✚Ana María Pabón

28-12-1940/30-11-2013

A mi **TIA NELLY** por ser mi madre de crianza, porque siempre creyó en mí.

✚Nelly Rodríguez Díaz

15-02-1956/21-02-2008

Su permanencia en los corazones de quienes tuvimos la fortuna de conocerlos vivirá por siempre.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**Conacyt**), por la beca otorgada, No. 570128, que me permitió desarrollar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (**Cinvestav**), por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de Posgrado.

Al **Dr. Juan José Peña Cabriales**, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad recibir sus enseñanzas a nivel académico y personal; por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

A mis asesores: **Dr. John Délano Frier** y **Dr. Agustino Martínez Antonio**, por su tiempo, por sus valiosos consejos y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Doralinda Guzmán Ortiz**, por el cariño recibido.

Al **M.C. José Antonio Vera Nuñez**, por su amistad, consejos y palabras de motivación.

Al **IBQ. Luis Ernesto Hernández Rodríguez**, por el apoyo técnico en el laboratorio, por las revisiones de mis escritos, por su valiosa amistad y por ser a veces la voz de mi conciencia.

Al **M.C. Sergio Abraham Hernández Covarrubias** y a la **M.C. Coyolxauqui Guadalupe Barrera Galicia**, por su incondicional amistad y porque se han convertido en mis hermanos mayores y están siempre dispuestos a ayudarme a levantar cuando sentía que todo estaba perdido.

Al **M.C. David Alfonso Camarena Pozos**, por sus consejos y apoyo en las revisiones del documento final.

A la **M.C. María Magdalena Cervantes Juan**, por su amistad y respaldo.

A las personas que durante mi estancia ha formado parte del equipo del laboratorio de Microbiología Ambiental: **Carlos, Jhonatan Noel, Jaime, Daniel, Mayra, Omar, Arantxa, Manolo, Jose Abraham** y **Anibal**.

A **Jorge Luis, Jhovany** y **Josué**, porque de ustedes fue más lo que aprendí que lo que enseñé.

Al **Dr. Jorge Molina** y su equipo de trabajo en el Laboratorio de Fitobioquímica, **Maestro Kike, Juan, Génesis, Tonatiu, Mary** y **Lala**, por sus enseñanzas y el apoyo brindado durante la última etapa de este trabajo.

A mis amigos mexicanos: **Lorena Rodríguez, Joel Marañón, Francisco Saldaña y César Rivera**, por su compañía y por “seguirme la cuerda”.

A mis amigos colombianos en México: **Andrea, Pilar, Erika, Jhonatan y Fredy** por hacerme sentir como en casa.

A **Dora Elia, Diana, Eduardo, Sarita, Juan Pablo y Baltazar** por todo el apoyo administrativo.

A **Humberto, Norma, Sra. Alicia, Rosy, Gabriel**, y el resto de compañeros y amigos de los laboratorios vecinos por su paciencia y colaboración.

A mi madre **Nohora Uribe**, por ser mi modelo a seguir en los roles de hija, mujer, madre y esposa.

A mi papá **Jesús**, por sus sacrificios para sacarnos adelante a pesar de todas las dificultades.

A mi hermana **Karla** y a mi prima **Katty** por la compañía, complicidad y amistad.

A mis hermanos **Steven** y **Juanes**, porque son mi motivación para superarme.

A **Josian**, por ser mi complemento perfecto.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
2.1 El petróleo: definición, tipo y composición química.....	5
2.2 Importancia del petróleo en México .....	6
2.2.1 Industria petrolera en Tabasco .....	6
2.2.2 Impactos ambientales de la Industria Petrolera en Tabasco.....	7
2.3 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	7
2.3.1 Degradación de HAP.....	9
2.4 Biorremediación en suelos .....	10
2.4.1 Bioestimulación .....	11
2.4.2 Bioaumentación .....	12
2.4.3 Biosurfactantes .....	12
2.5 Legislación ambiental en México: NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.....	14
JUSTIFICACIÓN .....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL .....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
3.1 Colecta y caracterización del suelo (contaminado y testigo, no contaminado).....	18
3.2 Cuantificación de bacterias heterótrofas cultivables .....	18
3.3 Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas.....	19
3.4 Selección de bacterias productoras de biosurfactantes.....	20
3.5 Identificación molecular de los aislados bacterianos .....	20
3.6 Caracterización de los microorganismos seleccionados.....	21
3.7 Establecimiento de consorcios bacterianos .....	21
3.8 Degradación de hidrocarburos en suelos .....	22
3.8.1 Respiración en suelos.....	22

3.8.2	Cuantificación de HTP: método gravimétrico .....	23
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1	Colecta y caracterización del suelo (contaminado y testigo -no contaminado-) .....	25
4.2	Cuantificación de bacterias heterótrofas cultivables .....	27
4.3	Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas .....	27
4.4	Selección de bacterias productoras de biosurfactantes.....	29
4.5	Identificación molecular de los aislados bacterianos .....	30
4.6	Caracterización de los microorganismos seleccionados.....	33
4.6.1	Caracterización Macroscópica y Microscópica .....	33
4.7	Establecimiento de consorcios bacterianos .....	34
4.8	Degradación de hidrocarburos en suelos .....	36
4.8.1	Respiración en suelos.....	36
4.6.1	Cuantificación de la degradación de hidrocarburos .....	41
V.	CONCLUSIONES .....	46
VI.	PERSPECTIVAS .....	47
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
	ANEXOS .....	54

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo <sup>1</sup> .....	14
Tabla 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo <sup>1</sup> .....	15
Tabla 3. Tratamientos y nomenclatura utilizados en los ensayos de “Respiración de suelos” y “Cuantificación de hidrocarburos en suelo”.....	24
Tabla 4. Características fisicoquímicas de los suelos. ....	25
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de las cepas aisladas con Fenantreno como fuente de carbono....	28
Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de las cepas aisladas con Antraceno como fuente de carbono .....	29
Tabla 7. Prueba de dispersión de gota en aislados bacterianos obtenidos de suelo contaminado con hidrocarburos y capaces de crecer en concentraciones de hasta 200 ppm de antraceno (A) o fenantreno (F).....	30
Tabla 8. Morfología colonial de los aislados bacterianos obtenidos de suelos contaminados con hidrocarburos y seleccionados, inicialmente, por su capacidad de crecer en altas concentraciones de antraceno (A) o fenantreno (F). 33	
Tabla 9. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y seleccionadas por su capacidad de crecer en altas concentraciones de antraceno (A) o fenantreno (F).....	33
Tabla 10. Antagonismo entre bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y capaces de crecer con hasta 200 ppm de antraceno (A) como única fuente de carbono.....	34
Tabla 11. Antagonismo entre bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y capaces de crecer con hasta 200 ppm de fenantreno (F) como única fuente de carbono .....	34
Tabla 12. Antagonismo entre los aislados bacterianos obtenidos de suelos contaminados con hidrocarburos y capaces de crecer con hasta 200 ppm de antraceno (A) o fenantreno (F) como única fuente de carbono. ....	35

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) más representativos .....	8
Figura 2. Rutas de degradación bacteriana de antraceno y fenantreno (de acuerdo a Phale et al., 2007).....	10
Figura 3. Esquema que muestra el uso de un ramnolípido, producido por <i>Pseudomonas</i> sp., para la ingesta de hidrocarburos .....	13
Figura 4. Etapas de selección y aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas.....	19
Figura 5. Prueba de difusión en agar y sensidiscos en agar nutritivo.....	22
Figura 6. Zona de muestreo, Tabasco-México. Más información.....	25
Figura 7. Prueba de dispersión de gota para evaluar la formación de biosurfactantes en bacterias capaces de crecer en concentraciones de antraceno de hasta 200 ppm. En a) se muestra una prueba negativa. En b), se muestra una prueba positiva, que consta de la formación de un halo alrededor de la película de hidrocarburos sobre la placa.....	30
Figura 8. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de bacterias aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos y capaces de crecer en 200 ppm de antraceno (A) o fenantreno (F). .....	32
Figura 9. Efecto de la inoculación de uno de los aislados bacterianos obtenido de suelos contaminados con hidrocarburos, sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	36
Figura 10. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de glucosa en la respiración de suelo contaminado con petróleo inoculado con consorcios bacterianos. ....	38
Figura 11. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de nitrato de amonio en la respiración de suelo contaminado con petróleo inoculado con consorcios bacterianos .....	40
Figura 12. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de nitrato de amonio y glucosa en la respiración de suelo contaminado con petróleo inoculado con consorcios bacterianos.....	42
Figura 13. Efecto de la bioestimulación en la degradación de HTP de suelo contaminado inoculado con los consorcios C1 y C2 y complementado con diversas fuentes adicionales de carbono (i.e. glucosa, [G]) y/o nitrógeno (i.e., nitrato de amonio, [A]). .....	43

## RESUMEN

Durante las actividades inherentes a la industria del petróleo es común que se presenten derrames de combustible causantes de problemas ambientales. Una estrategia para afrontar este problema es la implementación de sistemas de remediación que incluyan el aprovechamiento de la diversidad microbiana del suelo. El objetivo de este estudio fue identificar bacterias aisladas de un suelo contaminado con petróleo con características de interés que permitan su uso potencial en biorremediación. Para ello se realizó el aislamiento, selección e identificación de bacterias de suelo afectado por derrames frecuentes de petróleo del Complejo Procesador de Gas La Venta, localizado en el estado de Tabasco. Se realizaron conteos totales de microorganismos mediante la técnica de cuenta viable en superficie por diluciones; las bacterias fueron aisladas utilizando el medio Bushnell Haas con antraceno (A) o fenantreno (F) como fuente de carbono para enriquecer bacterias degradadoras de hidrocarburos. Se seleccionaron las bacterias que crecieron en 200 ppm de A y F en el medio de cultivo. Mediante la prueba de dispersión de gota se eligieron bacterias capaces de producir biosurfactantes que aumentan la biodisponibilidad de estos compuestos contaminantes en el medio. Los géneros que presentaron estas dos características de interés fueron identificados como *Sphingobium* sp., *Bosea* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. y *Phenylobacterium* sp. Posteriormente, se establecieron dos consorcios: el consorcio 1 (C1), conformado por *Sphingobium* sp. F5, *Bosea* sp. F7 y *Rhodococcus* sp. A15, y el consorcio 2 (C2), conformado por *Sphingobium* sp. F6, *Pseudomonas* sp. A17, y *Phenylobacterium* sp. A19. Los consorcios C1 y C2 fueron inoculados en suelo bajo condiciones *in vitro* en diferentes tratamientos de bioestimulación con adición de glucosa (G), nitrato de amonio (NA) o glucosa y nitrato de amonio simultáneamente (GA). Por último, se evaluó la respiración de suelos como parámetro indirecto de actividad microbiana, y el porcentaje de degradación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) por métodos gravimétricos. La inoculación del suelo con el consorcio C1 y la adición de nitrato de amonio al 1% fue el mejor tratamiento removiendo el 23% de los HTP en tan sólo 25 días. Esto demuestra que es posible mejorar el rendimiento de las alternativas biológicas de remediación integrando el uso de bacterias nativas del suelo contaminado como las condiciones nutrimentales del mismo.

## ABSTRACT

Oil spills due to petroleum extraction activity are very common and cause deleterious environmental problems. A way of confronting this problem is the implementation of a system that includes the microbial diversity of the soil. The aim of this study was to identify soil bacteria with a potential use in bioremediation. The isolation, selection and identification of bacteria was made from soil affected by frequent chronic oil spills. Soil was collected in South Eastern Mexico, namely in the vicinity of the “Complejo Procesador de Gas La Venta”, in the state of Tabasco. Total counts of microorganisms were performed using the viable count technique by dilutions surface. Bacteria were isolated using Bushnell Haas Broth with anthracene (A) or phenanthrene (Ph) as carbon sources to enrich for hydrocarbon degrading bacteria. Bacteria grown in 200 ppm of A or Ph in the culture media were selected. Also, a “drop collapse test” was employed to select bacteria capable of producing biosurfactants capable of increasing the bioavailability of these compounds in the medium. The genera that presented these two selecting characteristics were identified as *Sphingobium* sp., *Bosea* sp., *Pseudomonas* sp., and *Phenylobacterium* sp. Subsequently, two consortia were established: consortium 1 (C1), conformed by *Sphingobium* sp. F5, *Bosea* sp. F7 and *Rhodococcus* sp. A15, and consortium 2 (C2), conformed by *Sphingobium* sp. F6, *Pseudomonas* sp. A17, and *Phenylobacterium* sp. A19. Consortia C1 and C2 were inoculated in soil in *in vitro* conditions using different biostimulation treatments with the addition of glucose (G), ammonium nitrate (AN) or glucose and ammonium nitrate simultaneously (GAN). Finally, soil respiration was evaluated as an indirect parameter of microbial activity and the percentage degradation of total petroleum hydrocarbons (TPHs), by gravimetric methods. Soil inoculation with C1 and the addition of 1% AN proved to be the best treatment, removing 23% of TPHs in 25 days. The above evidence supports the possibility of improving the efficiency of biological remediation alternatives by integrating the use of native bacteria from contaminated soils with improved soil nutrient conditions.

## I. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una de las fuentes principales de energía a nivel mundial. Para satisfacer las necesidades del desarrollo económico de México, la industria extractiva del petróleo ha establecido infraestructura que interactúa con los ecosistemas terrestres que conducen petróleo crudo de los pozos de perforación a las petroquímicas (PEMEX, 2009).

Desde hace más de 40 años, las actividades inherentes a la industria petrolera en México han sido fuentes importantes de contaminación del suelo y agua, ocasionada por derrames, fugas, lodos y recortes de perforación (Trujillo *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1999; Maldonado *et al.*, 2010). Entre los componentes del petróleo, considerados como contaminantes abundantes y persistentes en suelo, se identifican a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que son compuestos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, constituidos por átomos de carbono e hidrógeno, y que debido a sus estructuras hidrofóbicas, son casi o totalmente insolubles en agua.

Los suelos contaminados con HAP presentan riesgos potenciales a la salud humana ya que algunos han sido reportados como carcinogénicos, citotóxicos o ecotóxicos (Srogi, 2007). También afectan negativamente los ecosistemas naturales, ya que este tipo de contingencias ambientales modifica la estructura del suelo, composición de la flora, fauna y microfauna. Existen diversas tecnologías fisicoquímicas y térmicas para la eliminación en suelo de HAP cuya desventaja es el elevado costo de implementación por volumen de suelo, como el lavado, con un costo de 170 USD/ t (Urum *et al.*, 2003), la extracción de vapor del suelo, con un costo de 20-50 USD/ t (Barnes, 2003), la aireación, con un costo estimado de 14,000 USD/ 0.76 m<sup>3</sup>, y la desorción térmica, con un costo de 50-330 USD/ t (Kahn *et al.*, 2004). Sin embargo, algunas de éstas tecnologías presentan limitaciones ambientales como la generación de cenizas y toxinas que pueden ser expulsadas a la atmósfera. Además, estos procesos pueden dejar al suelo como un residuo inerte y requieren de un alto consumo de energía (Haritash y Kaushik, 2009). En contraparte, los procesos que implican tratamientos biológicos son económicos y no perjudican al medio ambiente. Por ejemplo, tratar 0.4 hectáreas con 50 cm de profundidad por medio de fitorremediación cuesta entre 60,000-

100,000 USD, siendo un precio bajo comparado con un proceso físico, como la excavación y rellenado, que cuesta de 400,000 a 1,700,000 USD, (Nedunuri *et al.*, 2000).

Los microorganismos nativos del suelo adaptados a altas concentraciones de petróleo desarrollan actividades enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas *et al.*, 1991; Rivera *et al.*, 2002). Un ejemplo de esto son las bacterias hidrocarbonoclastas, es decir, aquellas bacterias capaces de degradar hidrocarburos. Otro ejemplo son las bacterias capaces de sintetizar biosurfactantes, que son metabolitos secundarios excretados por los microorganismos durante la fase estacionaria de crecimiento (Sulbarán *et al.*, 2005) que presentan una alta actividad de superficie y propiedades emulsificantes. Su principal papel fisiológico es el de incrementar la biodisponibilidad de HAP con el fin de permitir su degradación y reducir la tensión superficial (Bagheri *et al.*, 2009).

Es importante optimizar la biodegradación de HAP y continuar generando conocimientos que puedan ser aplicados para recuperar zonas impactadas por la industria petrolera. Por lo cual, el objetivo de este proyecto fue evaluar la degradación *in vitro* de hidrocarburos por parte de un consorcio de bacterias hidrocarbonoclastas y productoras de biosurfactantes, aisladas de suelo del estado de Tabasco afectado por derrames crónicos de petróleo.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 El petróleo: definición, tipo y composición química

La palabra petróleo es una palabra castellana que viene del latín “petroleum” (petra: piedra y óleum: aceite), es decir aceite de piedra. Es un líquido viscoso, de un color café oscuro (aceite crudo). Es una mezcla compleja de alcanos, cicloalcanos, alquenos y compuestos aromáticos; además, contiene pequeñas cantidades de oxígeno (O), azufre (S), nitrógeno, (N), e inclusive metales como el hierro (Fe) y el níquel (Ni).

La identificación del petróleo crudo en el ecosistema propone considerar el tiempo de exposición a factores ambientales por lo que se clasifica en petróleo fresco (PF) y petróleo intemperizado (PI) (Arias-Trinidad, 2012).

El PF es el crudo recién extraído de un yacimiento. Sus principales componentes son los hidrocarburos (compuestos químicos que contienen únicamente hidrógeno y carbono), los cuales representan el 50-98% en relación a la composición total (Clarck y Brown, 1977). El carbono (80-87%) y el hidrógeno (10-15%) son los principales y más abundantes elementos en el petróleo, aunque otros como el azufre (0-10%), nitrógeno (0-1%) y el oxígeno (0-5%) están presentes en cantidades menores ya sea en su forma elemental o bien como constituyentes heterocíclicos y de grupos funcionales. También, se reportan algunos metales traza como V, Ni, Fe, Al y Cu, cuya concentración va dependiendo del tipo de petróleo crudo y la región donde se formó. El PF contiene cuatro formas estructurales en función de la solubilidad en solventes orgánicos: compuestos saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Rivera-Cruz *et al.*, 2002).

El PI es un petróleo crudo que ha sido sometido en la superficie del suelo a un proceso de meteorización al menos durante 20 años (Botello, 2005; Rivera y Trujillo, 2004). Es una mezcla de compuestos recalcitrantes (resistencia a la degradación) del petróleo fresco (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005). Se compone principalmente de hidrocarburos saturados de cadena larga, compuestos cíclicos y policíclicos (OMI, 2005); hidrocarburos aromáticos e

hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Rivera *et al.*, 2002), y asfaltenos y resinas, que son mezclas de hidrocarburos que se encuentran en las fracciones pesadas (compuestos de elevado peso molecular) de los crudos y de los productos refinados pesados (Fernández *et al.*, 2006). La naturaleza hidrófoba de los hidrocarburos del PI complica su degradación, debido a la absorción de los hidrocarburos a la matriz del suelo lo que disminuye la velocidad y el grado de degradación de los hidrocarburos (Maletić *et al.*, 2011).

## **2.2 Importancia del petróleo en México**

El petróleo es el producto más indispensable para la dinámica económica de la industria en todo el mundo; de este se obtienen la mayor parte de los productos que son procesados y convertidos en bienes de consumo. En México, es uno de los principales productos que movilizan a toda la industria en general, desde los combustibles, como las gasolinas, gas, turbosina, etc., que son productos del petróleo con los que operan las industrias, hasta los plásticos, polietilenos, polímeros, que son indispensables para cualquier área industrial y comercial.

Según datos de los anuarios estadísticos de la empresa Petróleos Mexicanos (Pemex), la producción petrolera diaria durante 2015 fue de 2 millones 267 mil barriles (producción mínima desde 1986). Sin embargo, la importancia del petróleo en México radica en su alta demanda de exportación.

### **2.2.1 Industria petrolera en Tabasco**

En la zona continental del sureste de México la exploración y la perforación petrolera se iniciaron de manera comercial durante la década de 1940. A finales de los años cincuenta, se inició la perforación en la región noroeste del estado de Tabasco y, a partir de 1973, aumentó la superficie por el descubrimiento de importantes yacimientos petroleros en el área Comalcalco-Terciario.

De acuerdo a los estudios estadísticos y pruebas geográficas realizados por organismos como el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y Pemex, se considera que el estado de Tabasco es líder en producción en la industria petrolera y otros productos como el azufre,

debido a sus yacimientos y pozos. En el caso del crudo, Tabasco alcanzó en el 2014 una producción de 376 mil barriles diarios de petróleo. Además, de los 17 municipios del estado de Tabasco, 13 poseen instalaciones petroleras (Estratégica, 2011).

### **2.2.2 Impactos ambientales de la Industria Petrolera en Tabasco**

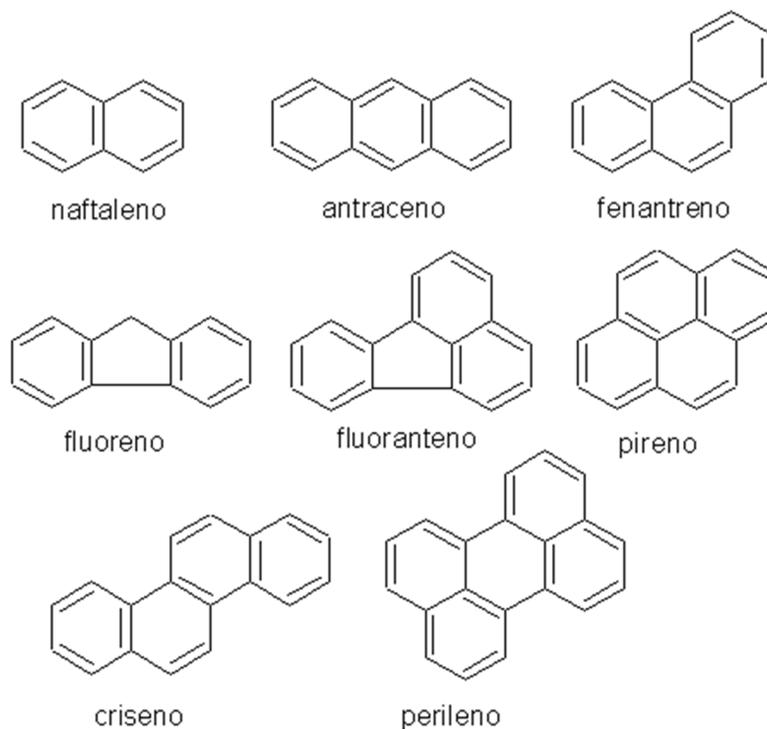
La industria petrolera en Tabasco se consolidó como área productiva por los volúmenes de petróleo crudo y gas, pero originó la degradación del suelo debido a frecuentes derrames de petróleo crudo o por deposición atmosférica de partículas transportadas por el aire (Trujillo-Narcia *et al.*, 2012). De acuerdo con la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (Profepa) durante el periodo de 1993 a 2009 ocurrieron en México 7,998 emergencias ambientales como derrames o fugas de los ductos, de las cuales 1,315 (16.44%) sucedieron en Tabasco. El 92.6% de los derrames o fugas de petróleo se acumularon en el suelo debido principalmente a fugas de ductos, originando problemas ambientales con graves repercusiones a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas (Profepa, 2011).

En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físicoquímicos simultáneos que, dependiendo de diversos factores, como el tipo de suelo, pueden ser más o menos lentos, lo que ocasiona una mayor toxicidad. En el agua, la mancha generada por los hidrocarburos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles, afectando a diversos organismos. Dicha contaminación ocasiona el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente, así como la desaparición de gran cantidad de especies vegetales y animales.

### **2.3 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos condensados. Los anillos pueden estar en forma recta,

angulados o racimados (Figura 1). Los HAP se forman por pirólisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno (Mastandrea *et al.*, 2005).



**Figura 1. Estructura química de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) más representativos**

Las características fisicoquímicas de los HAP son las que condicionan su comportamiento en el medio ambiente. Las dos más importantes son la hidrofobicidad y la recalcitrancia, que aumentan entre más anillos bencénicos estén presentes la estructura del hidrocarburo. Debido a sus propiedades hidrofóbicas, los HAP tienden a adsorberse a las superficies, hecho que dificulta su degradación (Clements *et al.*, 1994). Además de su elevada persistencia ambiental, los HAP representan un riesgo para la salud pública y en 1979 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés) incluyó los 16 HAP de 2 a 6 anillos más frecuentes, en su lista de contaminantes de investigación prioritaria (Keith y Telliard, 1979).

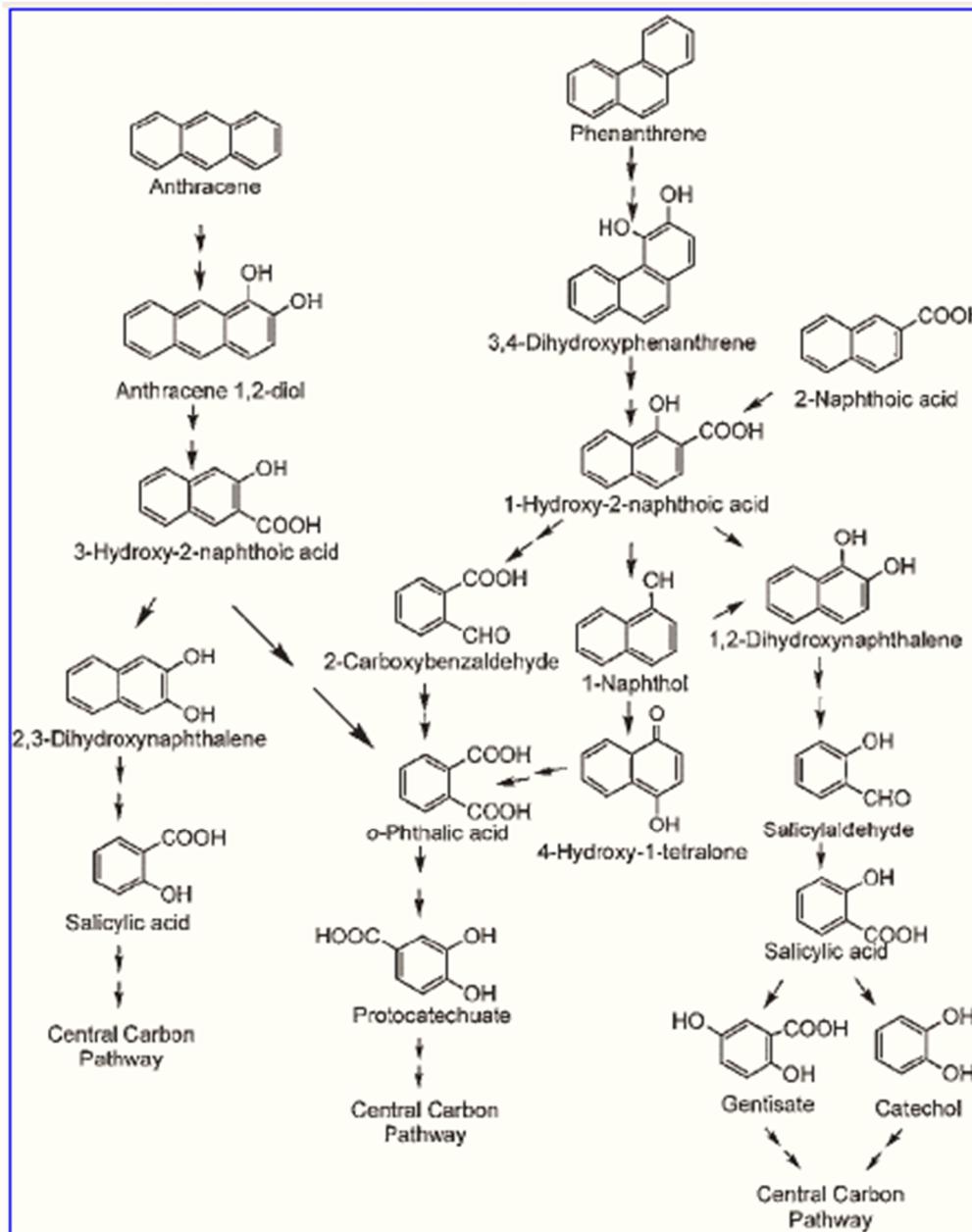
### 2.3.1 Degradación de HAP

Se sabe que los HAP son degradados, un anillo a la vez, por mecanismos similares a los de la degradación de los hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, la biodegradabilidad de los HAP tiende a disminuir conforme se incrementa el número de anillos que los constituyen y conforme se incrementa el número de radicales alquilo que poseen (Park *et al.*, 1990). El metabolismo microbiano del naftaleno, fenantreno y antraceno ha sido estudiado ampliamente.

El principal mecanismo que presentan la mayoría de bacterias, para degradar HAP de forma aeróbica, consiste en la oxidación del anillo bencénico por parte de dioxigenasas para formar *cis*-dihidrodiol. Estos dihidrodioles son dehidrogenados, formando intermediarios dihidroxilados, que pueden ser metabolizados, via catecoles, después de entrar a metabolismo central, hasta CO<sub>2</sub> y agua.

Actualmente, se han aislado bacterias capaces de degradar HAP de una gran variedad de entornos naturales, especialmente de suelos. Se dispone de numerosas especies capaces de utilizar naftaleno (2 anillos), fenantreno y antraceno (3 anillos), fluoranteno y pireno (4 anillos) como única fuente de carbono y energía. Entre los géneros a los que pertenecen dichas especies, destacan *Gordonia*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus* y *Staphilococcus*. Sin embargo, no se conocen bacterias capaces de crecer en HAP de 5 anillos como único sustrato. Por ejemplo, *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, *Mycobacterium* sp. RJGII-135, *Rhodococcus* sp. UW1, distintas cepas de *Burkholderia cepacia* y *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas yanoikuyae*, degradan Benzo(a)pireno pero, para ello, requieren la presencia de otras fuentes de carbono (Koukkou y Vandera, 2011)

Phale *et al.* (2007) esquematizan las vías de degradación bacteriana para triaromáticos (fenantreno y antraceno) (Figura 2)



**Figura 2. Rutas de degradación bacteriana de antraceno y fenantreno (de acuerdo a Phale *et al.*, 2007)**

## 2.4 Biorremediación en suelos

La biorremediación tiene como objetivo degradar o transformar compuestos peligrosos, utilizando microorganismos (normalmente, bacterias heterótrofas y hongos), en otros menos dañinos como: CO<sub>2</sub>, agua, sales inorgánicas y/o biomasa. La capacidad metabólica de las

poblaciones microbianas frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación (Alexander, 1999).

La biorremediación es una tecnología poco invasiva y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos que signifiquen una amenaza para el medio. Comparativamente, es económicamente viable y al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública. Sin embargo, la biorremediación puede llevar años para completar la restauración y recuperación de las áreas impactadas, dependiendo entre otros factores, de la cantidad de contaminante y de condiciones ambientales que favorezcan la proliferación y actividad de los organismos que se utilicen (Ferrera *et al.*, 2006).

Los suelos contaminados con hidrocarburos pueden presentar fuertes limitaciones que se deben tomar en cuenta al implementar tecnologías de biorremediación. Dependiendo del tipo de suelo y de matriz contaminante, así como de la microbiota presente, las estrategias habituales para favorecer la bioestimulación de las poblaciones autóctonas (e. g., humedad óptima, nutrientes en proporciones adecuadas, etc.) pueden no obtener los resultados que se esperarían. Como consecuencia de ello, el uso de biosurfactantes para aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes, de co-sustratos para añadir una fuente de carbono fácilmente asimilable para la microbiota capaz de degradar hidrocarburos, o el bioaumento de dicha microbiota, pueden ser estrategias a considerar. A continuación, se describen las estrategias mencionadas anteriormente, las cuales que fueron utilizadas en esta investigación.

#### **2.4.1 Bioestimulación**

La bioestimulación es una técnica de biorremediación que consiste en la modificación del medio para promover el crecimiento de los microorganismos nativos a través de la adición de nutrimentos, aceptores de electrones, surfactantes y oxígeno al suelo, y con ello, estimular el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Castillo *et al.*, 2005). Para el éxito de esta técnica se reporta que se deben tener por lo menos  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $g^{-1}$  de suelo, aunque otros factores como la estructura

molecular y la biodisponibilidad del contaminante en el suelo pueden afectar la efectividad de la bioestimulación.

Se ha demostrado que los fertilizantes inorgánicos contribuyen a la degradación de mayor cantidad de hidrocarburos totales de petróleo, debido a su disponibilidad y solubilidad en el suelo, lo que permite que los microorganismos degradadores nativos no tengan limitaciones nutrimentales (Vallejo *et al.*, 2005)

#### **2.4.2 Bioaumentación**

Esta técnica se utiliza cuando se requiere un tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando los microorganismos autóctonos son insuficientes en número o presentan limitada capacidad degradadora. Esta práctica consiste en adicionar microorganismos autóctonos o modificados genéticamente, capaces de degradar o transformar algún contaminante orgánico (Castillo *et al.*, 2005). Estos cultivos microbianos deben tener la capacidad de soportar las condiciones del suelo y ambientales, a la vez de competir con los demás microorganismos presentes en el suelo.

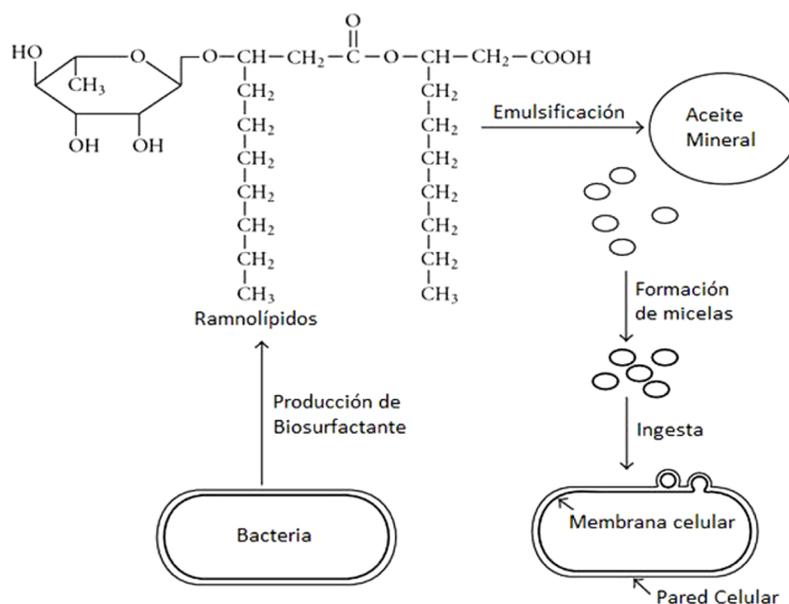
#### **2.4.3 Biosurfactantes**

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas producidas por microorganismos que tienden a reducir la tensión superficial e interfacial de las soluciones, así como, a formar emulsiones. Los biosurfactantes son producidos por bacterias, hongos y levaduras durante su crecimiento en una gran variedad de sustratos, lo cual genera productos con características bioquímicas y estructurales diversas. Dichos compuestos pueden permanecer adheridos a la superficie celular del microorganismo, o bien, ser expulsados al medio de cultivo (Cortés y Barragán, 2013).

Los surfactantes de origen biológico tienen varias ventajas sobre sus contrapartes sintéticas: son biodegradables y no se acumulan en el ambiente. Además, tienen bajo nivel de toxicidad y, lo más importante, es que presentan propiedades físicas y químicas (i. e., temperatura,

capacidad emulsificante, tolerancia al pH y fuerza iónica) superiores a las de los surfactantes sintéticos. Sin embargo, hacen falta estudios para encontrar procesos eficientes de obtención de éstos para que puedan ser económicamente competitivos respecto a los surfactantes químicos de bajo costo.

Cuando la fuente de carbono es un sustrato insoluble como un hidrocarburo, los biosurfactantes hidrofóbicos microbianos facilitan su difusión a la célula al cambiar la estructura de su membrana celular, o bien, generan biosurfactantes extracelulares que emulsifican el medio. En la Figura 3, se presenta el esquema de la ingesta de hidrocarburos por parte de *Pseudomonas* sp. que produce un biosurfactante de tipo ramnolípido (Mulligan, 2005). Es importante señalar que para la producción de surfactantes microbianos *in vitro*, es importante tener en cuenta tanto el medio de cultivo (e. g., fuentes de carbono, como nitrógeno, fósforo, y elementos traza, como Mg, Fe, Mn, etc.) como las condiciones de crecimiento, como temperatura, aireación, pH, etc., determinarán la cantidad y estructura del biosurfactante a nivel laboratorio (Bodour y Maier, 2003).



**Figura 3. Esquema que muestra el uso de un ramnolípido, producido por *Pseudomonas* sp., para la ingestión de hidrocarburos**

## 2.5 Legislación ambiental en México: NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

En México existe un gran número de sitios contaminados, principalmente con hidrocarburos del petróleo. Este hecho ha generado, en los últimos años, interés de las instituciones gubernamentales y privadas por la legislación y remediación de estos sitios.

Durante la remediación se debe tener en cuenta lo establecido en la legislación vigente, por lo cual es importante su conocimiento ya que en esta norma se establecen los límites máximos permisibles (LMP) de hidrocarburos en suelos y los lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

**Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo<sup>1</sup>.**

Fracción de hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/ kg base seca)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Ligera (C <sub>5</sub> -C <sub>10</sub> )	200	200	500
Media (C <sub>10</sub> -C <sub>28</sub> )	1,200	1,200	5,000
Pesada (C <sub>28</sub> -C <sub>40</sub> )	3,000	3,000	6,000

<sup>1</sup>Fuente: NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

En esta norma se define al suelo contaminado con hidrocarburos a aquel en el cual se encuentran presentes los hidrocarburos en una concentración mayor a los LMP establecidos y dicta que aquellos suelos que sobrepasen dichos límites deben ser remediados. La remediación del suelo se efectuará hasta alcanzar los límites máximos permisibles establecidos en esta norma o hasta cumplir con las acciones y niveles específicos de remediación producto del estudio de evaluación de riesgo ambiental, que en su caso se realice.

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se usan para describir una gran familia de compuestos químicos originados de petróleo crudo. Debido a que hay muchos productos químicos diferentes en el petróleo crudo y en otros productos de petróleo, no es práctico

medir cada uno en forma separada. Sin embargo, la determinación de los HTP es usada para la evaluación de sitios contaminados por hidrocarburos. El uso de concentraciones máximas de HTP para establecer los niveles de limpieza de muestras de suelo o agua contaminados con hidrocarburos es un enfoque común implementado por autoridades reglamentarias.

En la Tabla 2 se presentan los límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos, destacándose en negrita algunos HAP.

**Tabla 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo<sup>1</sup>**

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante (mg/ kg base seca)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100
<b>Benzo[a]pireno</b>	2	2	10
<b>Dibenzo[a,h]antraceno</b>	2	2	10
<b>Benzo[ a ]antraceno</b>	2	2	10
<b>Benzo[b]fluoranteno</b>	2	2	10
<b>Benzo[k]fluoranteno</b>	8	8	80
<b>Indeno (1 ,2,3-cd)pireno</b>	2	2	10

<sup>1</sup>Fuente: NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

## JUSTIFICACIÓN

En México, cerca del 88% de la energía primaria que se consume proviene del petróleo. Es la principal fuente de insumos para generar energía eléctrica, combustibles para el transporte y la industria. Además, es materia prima de una gran cantidad de productos como telas, medicinas o variados objetos de plástico. La industria petrolera de México ha establecido infraestructura para conducir petróleo que interactúa con los ecosistemas terrestres y como consecuencia se ha ocasionado la contaminación del suelo y agua. De acuerdo con datos publicados por Pemex en su informe anual del año 2013, durante ese año se presentaron 153 derrames que corresponden a 24 millones de pies cúbicos que se incorporaron al suelo. Como ya se mencionó, los suelos con hidrocarburos del petróleo derivados del petróleo fresco y del petróleo intemperizado representan riesgos en la salud y al ambiente (Mohsenzade *et al.*, 2009).

Como alternativa de limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo se ha acudido a la utilización de elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de estos contaminantes (Ferrera *et al.*, 2006). El uso de consorcios microbianos ha sido una técnica bastante estudiada e implementada en muchos casos de contaminación de petróleo en suelo y agua. No obstante, el tiempo que requieren dichos consorcios para lograr una biodegradación efectiva (en términos prácticos) aún resulta una limitante. Una forma de acelerar este proceso es mediante la adición de biosurfactantes (Sen, 2010); éstos intensifican la emulsificación de hidrocarburos, permitiendo su solubilización e incrementando su biodisponibilidad para la degradación microbiana. A diferencia del uso de surfactantes químicos para el tratamiento de contaminación por hidrocarburos, que pueden resultar en una contaminación ambiental colateral debido a los subproductos tóxicos no biodegradables, los métodos biológicos son más seguros para el ambiente y en ocasiones más eficientes.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es establecer un consorcio microbiano donde se incluyan bacterias que tengan capacidad de producir biosurfactantes y que, a su vez, sean capaces de degradar hidrocarburos.

## **HIPÓTESIS**

El uso de consorcios de bacterias hidrocarbonoclastas y productoras de biosurfactantes, aisladas de suelo contaminado con petróleo, incrementará la degradación de hidrocarburos en suelos bajo condiciones controladas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar bajo condiciones de laboratorio el efecto de la bioestimulación en la degradación de hidrocarburos por consorcios de bacterias aisladas de un suelo contaminado por derrames crónicos de petróleo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar fisicoquímicamente el suelo proveniente del Complejo Procesador de Gas La Venta, localizado en el estado de Tabasco (suelo contaminado) y de un suelo testigo (no contaminado) de la misma zona.
- Aislar, seleccionar, identificar y caracterizar bacterias hidrocarbonoclastas y/ o productoras de surfactantes del suelo contaminado.
- Establecer consorcios microbianos, que incluyan bacterias con características de interés, para la degradación de hidrocarburos.
- Evaluar el desempeño de los consorcios microbianos en la degradación de hidrocarburos en suelo bajo diferentes niveles crecientes de glucosa y nitrato de amonio mediante ensayos *in vitro* de respiración y cuantificación de degradación de hidrocarburos totales de petróleo.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Colecta y caracterización del suelo (contaminado y testigo, no contaminado)**

El suelo contaminado con petróleo intemperizado fue colectado a 2 km al sureste del Complejo Procesador de Gas la Venta, Huimanguillo, en el ejido José Narciso Roviroso, municipio de Huimanguillo, Estado de Tabasco, México. La vegetación del sitio corresponde en su mayoría al pasto japonesa (*Leersia* sp.) y a plántulas de tulillo (*Cyperus articulatus*). El suelo testigo se localizó en el km 58 de la carretera federal 180 tramo Coatzacoalcos-Villahermosa, ejido Blacillo, perteneciente al Estado de Tabasco. La vegetación dominante del sitio está conformada por popales (*Thalia geniculata*), la leguminosa arbustiva, también nativa, denominada zarza (*Mimosa pigra*) y pasto alemán (*Echinochloa polystachya*).

Las muestras de suelo fueron secadas y tamizadas para su posterior almacenamiento. La concentración de contaminantes fue determinada mediante protocolo 3540B de la US EPA (1996). Para el análisis nutrimental, 1 kg de suelo seco fue enviado para su análisis al Laboratorio de Fertilidad Suelos y Nutrición Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) sede Celaya, Gto.

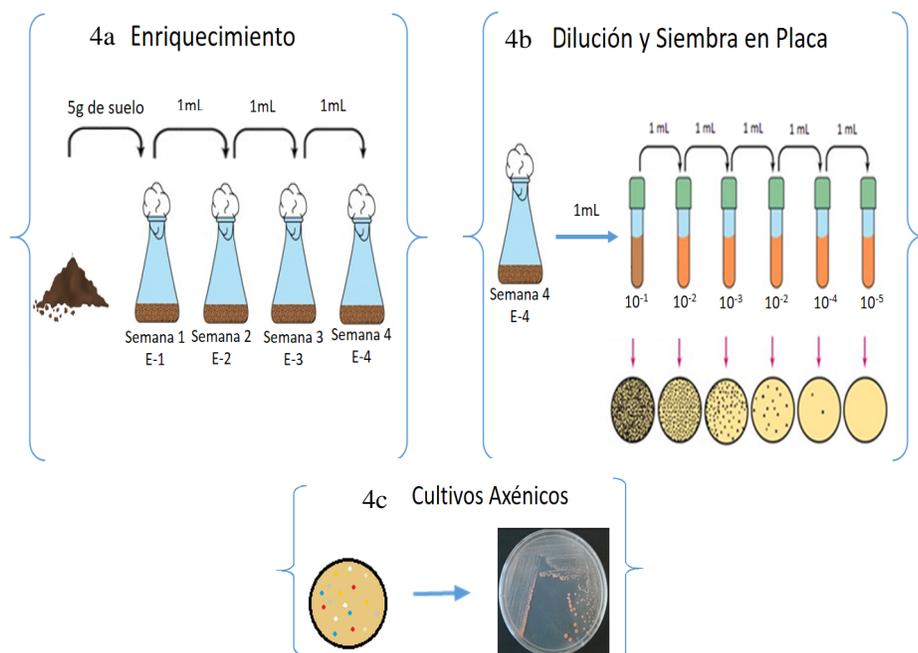
#### **3.2 Cuantificación de bacterias heterótrofas cultivables**

La cuantificación de bacterias heterótrofas cultivables se realizó con el método de conteo de células vivas por siembra en superficie (Madigan *et al.*, 1998). Se utilizaron diluciones seriadas en base 10. Se diluyeron 10 g de suelo (contaminado y no contaminado) en 90 mL de agua estéril, hasta alcanzar una dilución de  $1/10^8$ . Se tomó 1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de la caja Petri con agar nutritivo, se distribuyó uniformemente con asa de Drigalski. El procedimiento, se realizó por triplicado. Las cajas se incubaron durante 48 h y se hicieron los respectivos conteos.

### 3.3 Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas

Para el aislamiento de bacterias degradadoras de HAP se siguió la metodología propuesta por Mandri y Lin (2007), empleando el medio líquido Bushnell-Haas (BH), suplementado con 1000 ppm de A o F como fuente de carbono. Semanalmente se realizaron pases a medio fresco con el fin de enriquecer las bacterias hidrocarbonoclastas. Este procedimiento se realizó durante cuatro semanas (Figura 4a). Posteriormente, se realizaron diluciones y siembra en placas de agar nutritivo (AN), (Figura 4b), y dependiendo de las características de la morfología colonial, fueron seleccionadas 30 colonias para su posterior estriado en medio sólido hasta la obtención de cultivos puros (Figura 4c).

Además, se realizó un experimento que consistió en sembrar cada uno de los aislados en caldo BH adicionado con 100 y 200 ppm de A o F. Los cultivos fueron incubados a 30°C y 150 rpm durante ocho días. Pasado el tiempo de incubación, se resembraron por triplicado en medio BH para observar si hubo o no crecimiento de las bacterias, y con esto seleccionar a las bacterias más resistentes a estas concentraciones de HAP en el medio líquido.



**Figura 4. Etapas de selección y aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas.**

En (a) se muestra la etapa de enriquecimiento. En (b) la dilución y siembra en placa y en (c) el establecimiento de cultivos axénicos.

### **3.4 Selección de bacterias productoras de biosurfactantes**

Las cepas aisladas fueron sembradas en 50 mL de medio líquido proteosa-peptona-glucosasa de amonio, PPGAS (por sus siglas en inglés) e incubadas a 37°C y 115 rpm durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron 1.5 mL de medio a microtubos de centrifuga Eppendorf y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para la prueba de dispersión de gota (Morikawa *et al.*, 2000). Esta prueba permite detectar la producción cualitativa de biosurfactantes debido a la formación de un halo de emulsión sobre una capa de hidrocarburo. Para la realización de esta prueba se utilizaron placas Petri 90 mm de diámetro a las cuales se les agregó 20 mL de agua destilada y 1 gota de petróleo crudo, formando una capa homogénea. Posteriormente se depositaron 20 uL del sobrenadante del cultivo microbiano y se observó si hubo o no formación de un halo de emulsión sobre la superficie.

### **3.5 Identificación molecular de los aislados bacterianos**

Se extrajo ADN genómico de los 30 aislados utilizando el kit PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para comprobar la concentración y pureza del ADN genómico se utilizaron geles de agarosa al 1% y cuantificación por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para la identificación molecular se realizó la amplificación del gen 16S ARN ribosomal mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando los oligos: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3'). La PCR se realizó en un volumen de 50 µL [5 µL de 10 × buffer de PCR, 1 µL de solución de dNTP (10 mM), 2.0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL de cada primer (27F y 1492R) (50 ng/ µL), 0.2 µL de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 5 U/ µL (Invitrogen), 2 µL de ADN genómico purificado (~40 ng) y se llevó al volumen final con agua desionizada estéril], y bajo las siguientes condiciones: 95°C por 180 s, 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 90 s para un total de 38 ciclos y una extensión final a 72°C durante 180 s.

La amplificación, concentración y pureza de los amplicones se comprobó mediante electroforesis con gel de agarosa al 1% así como cuantificación por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000). Una vez confirmada la amplificación, se procedió a purificar el producto de PCR utilizando el kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). Alícuotas de 15 µL de producto de PCR purificado fueron enviados al Laboratorio de Servicios Genómicos de la Unidad de Genómica Avanzada del CINVESTAV-IPN, Unidad-Irapuato, para su secuenciación por ambos lados mediante el método Sanger.

Los electroferogramas resultantes de la secuenciación Sanger se editaron en el programa *Geneious* para obtener un concatenado del cual se extrajo la secuencia consenso. Para la identificación taxonómica se procedió a hacer un BLASTN con un corte de “e-value” de 0.1 con las secuencias en la base de datos SILVA y se les dio a las secuencias el nombre del mejor hit, usando como criterio de corte el 98% de similitud.

### **3.6 Caracterización de los microorganismos seleccionados**

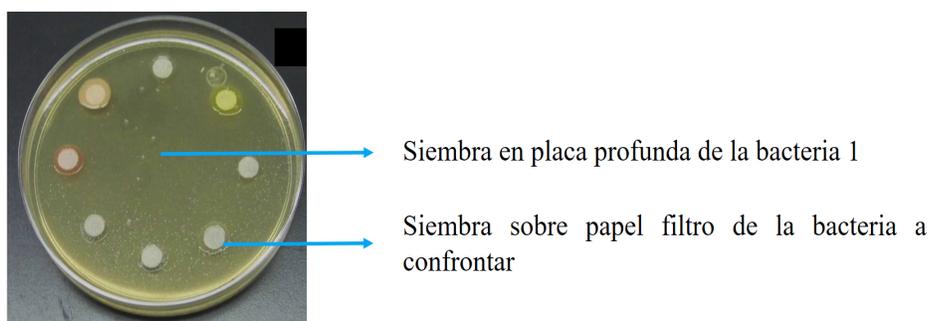
Los microorganismos aislados fueron sembrados en estría cruzada en medio sólido R2A. A partir de su crecimiento se observaron las características macroscópicas de las colonias separadas. Es decir, forma, elevación, borde, tamaño, superficie, consistencia, color y aspecto. También fueron sembradas en caldo LB (sin agitación) para evaluar la formación de biopelículas (Franchi *et al.*, 2016).

Para la caracterización microscópica de las bacterias, se realizaron tinciones de Gram. Las tinciones fueron observadas con el objetivo 100 × del microscopio LEICA DM E, con el fin de distinguir su forma (e. g., bacilo, coco, bacilo cocos, vibrio, etc.).

### **3.7 Establecimiento de consorcios bacterianos**

Con el fin de garantizar la ausencia de algún tipo de inhibición entre los microorganismos que conforman los consorcios, se determinó el efecto antagónico de las bacterias seleccionadas, mediante la prueba de difusión en agar y sensidiscos, usando una metodología modificada de Pérez *et al.* (2014). Se inocularon  $1 \times 10^8$  UFC/ ml de la bacteria a confrontar, en un matraz

que contenía caldo nutritivo a punto de solidificar. Luego, se vació en placas Petri y se dejaron enfriar durante 10 min. Posteriormente a cada una de las placas se le depositaron discos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro, que posteriormente fueron humedecidos con cada una de las cepas utilizadas como antagonistas. Éstos fueron colocados en la caja Petri de manera radial, como se muestra en la Figura 5. Por último, las placas fueron incubadas a 29°C durante 24 h. La lectura de resultados de las placas se hizo observando el crecimiento de las bacterias inoculadas en los discos.



**Figura 5. Prueba de difusión en agar y sensidiscos en agar nutritivo**

En placa profunda se sembró *Pseudomonas* sp. A17 y sobre los discos de papel filtro fueron colocados las bacterias a confrontar

### 3.8 Degradación de hidrocarburos en suelos

Se determinó la actividad microbiana en los suelos contaminados mediante el parámetro indirecto de respiración de suelos y se cuantificaron los hidrocarburos totales del petróleo con los métodos EPA 3540C (1996a) y 9071B (1998), y algunas modificaciones propuestas por Pons-Jimenez *et al.* (2011).

#### 3.8.1 Respiración en suelos

El desprendimiento de CO<sub>2</sub> se midió a diario durante 25 días siguiendo el método propuesto por Stotzky (1965). En un frasco de vidrio, se dispusieron 100 g de suelo contaminado humedecido a 2/3 de su capacidad de campo. Dentro de este frasco, se dispuso otro frasco chico de boca ancha conteniendo 5 mL de NaOH 0.2N. El desprendimiento de CO<sub>2</sub> se estimó mediante titulación de la base con HCl 0.1N, en presencia de tres gotas de fenolftaleína y luego de la precipitación de los carbonatos con 2.5 mL de BaCl<sub>2</sub> 1M. Se consideraron tres

blancos (vasos vacíos), sin adición de suelo, para determinar la presencia de CO<sub>2</sub> basal en los frascos. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio de 500 mL. La incubación se realizó a temperatura ambiente (28 ± 2°C). Cada unidad experimental fue replicada 3 veces. Las muestras para titulación fueron tomadas cada 24 h.

La emisión de CO<sub>2</sub> se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$R = (B-M) NE$$

donde:

R = respiración microbiana, en mg de CO<sub>2</sub>

B = volumen de HCl necesario para titular el NaOH del promedio de los blancos (en mL)

M = cantidad de HCl necesaria para titular el NaOH de la muestra (en mL)

N = normalidad del ácido, en eq g/ L

E = peso equivalente del CO<sub>2</sub>

En el Anexo 1 se encuentra un esquema que representa lo realizado en este experimento.

Los tratamientos y la nomenclatura utilizada en este experimento se describen más adelante en la Tabla 3.

### **3.8.2 Cuantificación de HTP: método gravimétrico**

Las muestras de suelo se tomaron de las unidades experimentales del experimento de respiración de suelos y fueron analizadas mediante extracción Soxhlet y detección gravimétrica, de acuerdo con los métodos EPA 3540C (1996a) y 9071B (1998), respectivamente, utilizando diclorometano como solvente (Pons-Jimenez *et al.*, 2011). Se realizaron 48 ciclos de extracción en el equipo Extraction Unit E-812 / E-816 SOX BUCHI; (Flawil, Suiza); el extracto fue secado en un Multivapor BUCHI P-12. Por último, se capturaron los datos del peso seco del extracto en una balanza analítica de precisión Ohaus Adventurer (Parsippany, NJ, USA).

Los tratamientos y la nomenclatura utilizada en este experimento también se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3. Tratamientos y nomenclatura utilizados en los ensayos de “Respiración de suelos” y “Cuantificación de hidrocarburos en suelo”.**

Tratamiento	Nomenclatura	Respiración de suelo	Cuantificación de HTP
1*	Suelo testigo	(-)****	(+)
2*	Suelo contaminado (SC)	(-)***	(+)
3*	Atenuación natural (AN)	(-)	(+)
4*	Sin inóculo + glucosa 2%	(+)	(+)
5*	<sup>1</sup> C1-Bioestimulación (sin aplicación de nutrientes)	(+)	(+)
6	C1 + glucosa 0.05%	(+)	(+)
7	C1 + glucosa 1%	(+)	(+)
8	C1 + glucosa 2%	(+)	(+)
9	C1 + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	(+)	(+)
10	C1 + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	(+)	(+)
11	C1 + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	(+)	(+)
12	C1 + glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	(+)	(+)
13	C1 + glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	(+)	(+)
14	C1 + glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	(+)	(+)
15*	<sup>2</sup> C2-Bioestimulación (sin aplicación de nutrientes)	(+)	(+)
16	C2 + glucosa 0.05%	(+)	(+)
17	C2 + glucosa 1%	(+)	(+)
18	C2 + glucosa 2%	(+)	(+)
19	C2 + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	(+)	(+)
20	C2 + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	(+)	(+)
21	C2 + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	(+)	(+)
22	C2 + glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	(+)	(+)
23	C2 + glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	(+)	(+)
24	C2+ glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	(+)	(+)
25*	Blancos titulación **	(+)	(-)

<sup>1</sup>C1: Consorcio 1 (*Sphingobium* sp. F5, *Bosea* sp. F7 y *Rhodococcus* sp. A15);

<sup>2</sup>C2: Consorcio2 (*Sphingobium* sp. F6, *Pseudomonas* sp. A17 y *Phenylobacterium* sp. A19).

\*Controles; \*\*Unidad experimental sin suelo, el vaso interior contiene NaOH; \*\*\*No se midió respiración en estos tratamientos ya que el SC es representado por el tratamiento de AN.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Colecta y caracterización del suelo (contaminado y testigo -no contaminado-)

La zona de muestreos y colecta de suelos se encuentra representada en la figura 6.



**Figura 6. Zona de muestreo, Tabasco-México. Más información....**

El suelo analizado contiene 26,800 mg/ kg de HTP, base seca, lo cual indica que es un suelo altamente contaminado pues rebasa el límite máximo permisible establecido por la NOM 138 SEMARNAT 2012 que es de 6,000 mg/ kg<sup>-1</sup> de HTP para suelos de uso industrial y comercial (Tabla 2). Las características fisicoquímicas de los dos suelos se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Características fisicoquímicas de los suelos.**

Suelo	pH	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)	Tipo de suelo	DA <sup>a</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	MO <sup>b</sup> (%)	CC <sup>c</sup> (%)
Control No contaminado	6.54	41.48	33.96	24.56	Franco Arcilloso	0.94	11.85	67.50
Contaminado	6.5	65.48	17.96	16.56	Franco Arenoso	1.02	7.23	52.50

<sup>a</sup>DA= Densidad aparente; <sup>b</sup>MO = Materia orgánica; <sup>c</sup>CC = Capacidad de campo.

Los suelos resultaron ser moderadamente ácidos (Moreno 1978). Sin embargo, en relación a su pH, éste se encuentra dentro del rango ideal para la disponibilidad de nutrientes, formación de minerales, descomposición de materia orgánica y por lo tanto, una alta actividad biológica

(Siebe y Jahn 1996). La ligera acidificación del suelo puede ser atribuida a la posible degradación de hidrocarburos ya que, durante este proceso, se van generando ácidos orgánicos.

Con respecto a la textura del suelo contaminado se observa que el porcentaje de arena tiende a aumentar y el de arcilla y limo a disminuir. La textura se ve modificada debido a la adsorción del petróleo crudo por las partículas del suelo en concordancia con los resultados obtenidos por Martínez y López (2001).

La densidad aparente se encuentra en valores cercanos a  $1\text{ g/cm}^3$ , atribuible a la concentración de hidrocarburos y a la presencia de materiales orgánicos, los cuales se encuentran inmovilizados por la saturación de agua que presenta la zona durante la mayor parte del año.

La materia orgánica fue determinada por el método de Walkley-Black que consiste en una oxidación con dicromato de potasio diluido en un medio fuertemente ácido, donde el dicromato se consume para oxidar la materia orgánica. La parte que no reacciona se cuantifica con sulfato ferroso amoniacal valorado (Olson *et al.*, 1982). En este caso, el contenido de materia orgánica del suelo contaminado es la suma de la materia biogénica (por la descomposición de vegetales y animales) y materia petrogénica (por hidrocarburos). Con base en lo anterior, es de suponer que los compuestos saturados, poliaromáticos y de cadenas largas del petróleo crudo son difíciles de oxidar en las condiciones del método Walkley-Black, por lo sólo una parte de sus componentes es de fácil oxidación, los cuales reaccionan de manera que dan un valor menor comparado con los resultados obtenidos para el suelo no contaminado.

En general, los resultados de los análisis físico-químicos del suelo testigo, no contaminado, evidenciaron que es un suelo con propiedades químicas favorables para el crecimiento microbiano, tal como se demuestra en el siguiente apartado.

## 4.2 Cuantificación de bacterias heterótrofas cultivables

La comparación de las medias de las poblaciones bacterianas de los dos tipos de suelo mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La población más grande ( $9.2 \times 10^7$  UFC/ g suelo seco [s. s.]) correspondió al suelo no contaminado y fue 87 veces mayor que la población reportada para el suelo contaminado ( $1.06 \times 10^6$  UFC/ g s. s.). Lo anterior indica que el contaminante ejerce un efecto negativo sobre el número de UFC de bacterias heterótrofas cultivables. Esto se debe posiblemente a que la tolerancia microbiana a la presencia de petróleo en el suelo induce la selectividad y por ende a la disminución del número y diversidad de microorganismos.

## 4.3 Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas

Se obtuvieron 11 cepas aisladas de medio de cultivo con F como fuente de carbono y 19 aisladas de medio de cultivo con A como fuente de carbono. Las características de morfología colonial de las 30 cepas de bacterias aisladas son diversas: se encontraron colonias puntiformes, circulares y filamentosas, además de transparentes, amarillas, rosadas y blancas. Todas presentaron borde liso y su elevación iba desde colonias planas hasta convexas bajas. El estudio microscópico mostró formas redondas individuales y en grupos, bacilares y cocobacilos, en su mayoría Gram negativas. La descripción macroscópica y microscópica de estos 30 microorganismos aislados se muestra detalladamente en el Anexo 2.

Los resultados de la prueba de la concentración mínima inhibitoria (CMI) realizada a los 30 aislados se presentan en las Tablas 5 y 6. Como control negativo se utilizó una cepa de la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental, aislada de la rizósfera de maíz cultivado en el Estado de Guanajuato e identificada como *Burkholderia* sp.

**Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de las cepas aisladas con Fenantreno como fuente de carbono**

Cepa	Concentración de Fenantreno (F) (ppm)	
	[100]	[200]
F1	+ <sup>1</sup>	- <sup>2</sup>
<b>F2<sup>3</sup></b>	+	+
<b>F3</b>	+	+
F4	+	-
<b>F5</b>	+	+
<b>F6</b>	+	+
<b>F7</b>	+	+
F8	+	-
F9	+	-
F10	+	-
F11	+	-
Control (-)	-	-

<sup>1</sup>(+) Crecimiento de colonias (-); <sup>2</sup>No hubo crecimiento de las colonias; <sup>3</sup>Las colonias capaces de crecer en ambas concentraciones de F se muestran en negritas

Con el ensayo de CMI se seleccionaron los aislados F2, F3, F5, F6 y F7 (Tabla 5), así como los aislados A2, A8, A12, A15 y A19 (Tabla 6) por ser los que presentaron crecimiento en 200 ppm de F y A, respectivamente, en el medio líquido.

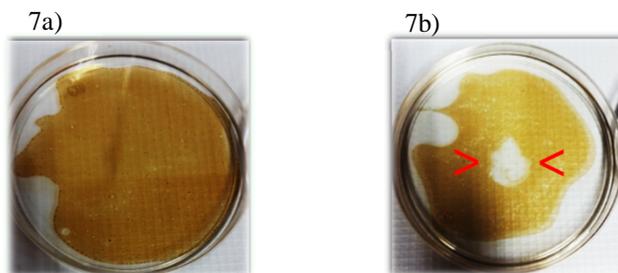
**Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de las cepas aisladas con Antraceno como fuente de carbono**

Cepa	Concentración de Antraceno (A) (ppm)	
	[100]	[200]
A1	+ <sup>1</sup>	- <sup>2</sup>
<b>A2<sup>3</sup></b>	+	+
A3	+	-
A4	+	-
A5	+	-
A6	-	-
A7	+	-
<b>A8</b>	+	+
A9	+	-
A10	+	-
A11	-	-
<b>A12</b>	+	+
A13	+	-
A14	+	-
<b>A15</b>	+	+
A16	-	-
A17	+	-
A18	+	-
<b>A19</b>	+	+
Control (-)	-	-

<sup>1</sup>(+) Crecimiento de colonias (-); <sup>2</sup>No hubo crecimiento de las colonias; <sup>3</sup>Las colonias capaces de crecer en ambas concentraciones de A se muestran en negritas

#### **4.4 Selección de bacterias productoras de biosurfactantes**

En la Figura 7a se muestra un ejemplo donde no hubo formación de halo por parte del aislado A9, mientras que en 7b se observa el halo formado por la cepa A17.



**Figura 7. Prueba de dispersión de gota para evaluar la formación de biosurfactantes en bacterias capaces de crecer en concentraciones de antraceno de hasta 200 ppm. En a) se muestra una prueba negativa. En b), se muestra una prueba positiva, que consta de la formación de un halo alrededor de la película de hidrocarburos sobre la placa.**

Los resultados de la prueba de dispersión de gota se encuentran en la Tabla 7. Se destacan los aislados F5, F6, F7, F9, F10, A11, A12, A17 y A19, en la formación de halo. Es decir, la evidencia sugiere fuertemente que son productoras de biosurfactantes.

**Tabla 7. Prueba de dispersión de gota en aislados bacterianos obtenidos de suelo contaminado con hidrocarburos y capaces de crecer en concentraciones de hasta 200 ppm de antraceno (A) o fenantreno (F).**

Cepa	F1	F2	F3	F4	<b>F5<sup>4</sup></b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>	F8	<b>F9</b>	<b>F10</b>
Halo	- <sup>1</sup>	-	-	+ <sup>2</sup>	++ <sup>3</sup>	++	++	+	++	++
Cepa	F11	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
Halo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cepa	A10	<b>A11</b>	<b>A12</b>	A13	A14	A15	A16	<b>A17</b>	A18	<b>A19</b>
Halo	-	++	++	+	-	+	+	++	+	++

<sup>1</sup>(-) Ausencia de halo; <sup>2</sup>(+) Formación de halo; <sup>3</sup>(++) Formación de halo de mayor diámetro; <sup>4</sup>Las colonias capaces de crecer en 200 ppm de A o F se muestran en negritas

#### 4.5 Identificación molecular de los aislados bacterianos

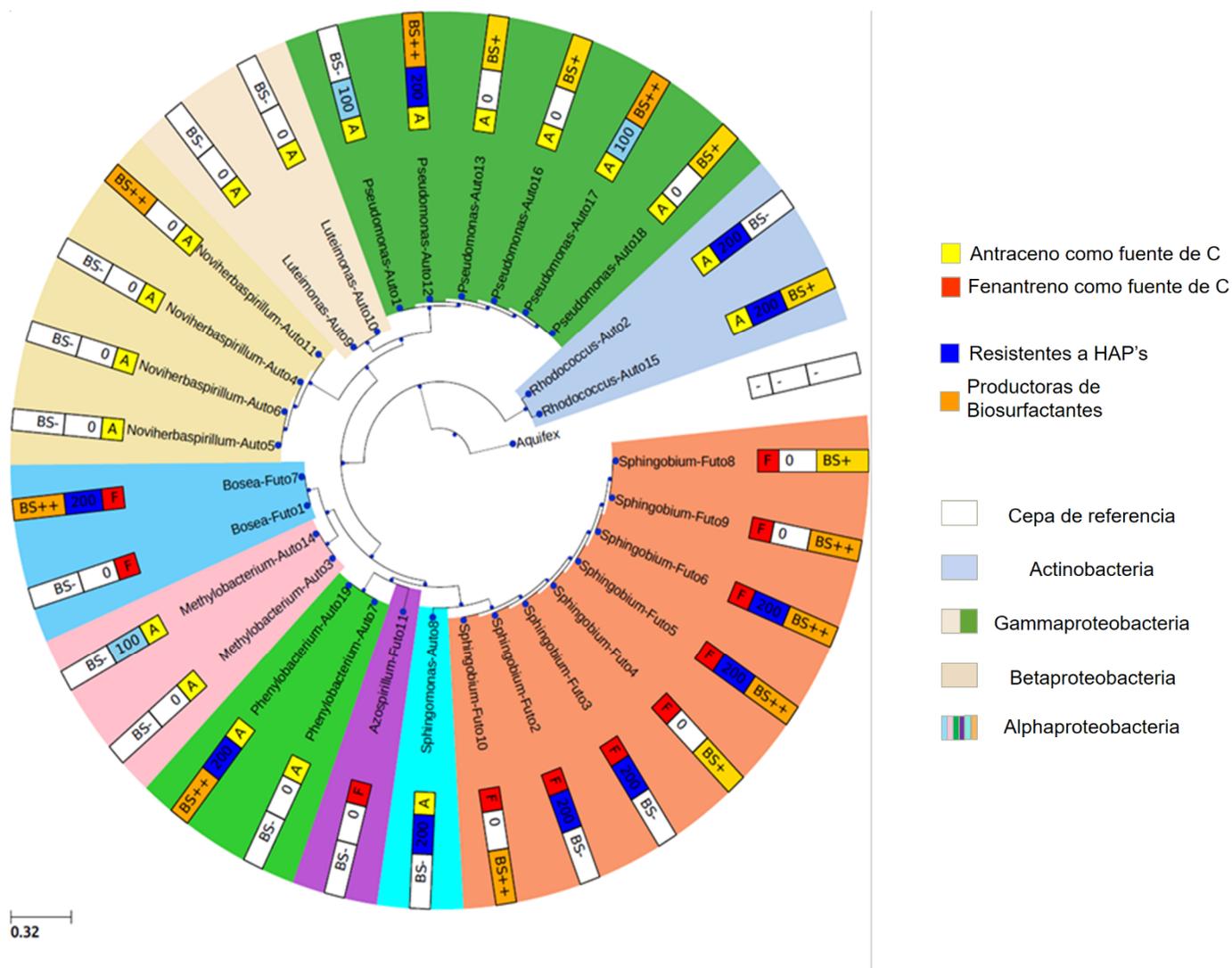
Los 30 aislados fueron identificados molecularmente a nivel de género por medio del marcador molecular 16 s ARN ribosomal. En la Figura 8 se muestra un árbol filogenético donde también se incluyen las características de mayor importancia en este proyecto sirviendo como herramienta para resumir y seleccionar los microorganismos con los que se

realizaron los subsiguientes experimentos. Los cuadros de color amarillo representan a las bacterias que fueron aisladas con A como fuente de carbono, mientras que los cuadros de color rojo representan a las bacterias aisladas con F como fuente de carbono. En tonos azules se muestra la resistencia a los HAP (azul oscuro: 200 ppm; azul cielo: 100 ppm y blanco: 0 ppm). También se señala en tonos naranjas la producción de biosurfactantes, (naranja representa a los que formaron halos de dispersión de tamaño grande, de amarillo los que formaron halos de menor diámetro y en blanco aquellos que no formaron halos dispersión).

Las bacterias seleccionadas tanto por su capacidad de resistencia a altas concentraciones de hidrocarburos, así como por su capacidad de producir biosurfactantes fueron las siguientes: *Sphingobium* sp. [F5], *Sphingobium* sp. [F6] y *Bosea* sp. [F7], aisladas con F como fuente de carbono, y *Pseudomonas* sp. [A12], *Pseudomonas* sp. [A17], *Rhodococcus* sp. [A15] y *Phenylobacterium* sp. [A19], aisladas con A como fuente de carbono.

*Sphingobium* [F5] y [F6] aparentemente son bacterias fijadoras de nitrógeno, por su crecimiento en medio LGI en una investigación paralela realizada en el Laboratorio de Micorbiología Ambiental del Cinvestav-Unidad Irapuato. Esto concuerda con reportes donde indican que éste género tiene la capacidad de fijar nitrógeno (Xie y Yocota, 2006), además de degradar hidrocarburos aromáticos (Zylstra y Kim, 1997).

Los géneros de *Pseudomonas* y *Rhodococcus* han sido ampliamente utilizados en estudios de biorremediación por su capacidad de degradación de hidrocarburos y producción de biosurfactantes (Petrikov *et al.*, 2013; Cortés y Barragán, 2013). Al-Mailem y colaboradores, (2014) reportaron a *Bosea* como un género de bacterias capaces de degradar hidrocarburos y de producir “biofilms”. Del género *Phenylobacterium* se sabe que ha sido aislado de lugares contaminados con pesticidas, pero se desconoce sobre su capacidad biorremediadora en suelos contaminados con hidrocarburos.



**Figura 8. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de bacterias aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos y capaces de crecer en 200 ppm de antraceno (A) o fenantreno (F).**

Se utilizó una distribución gamma para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (5 categorías (+ G, el parámetro = 0,2935)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidos en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 31 secuencias de nucleótidos. La edición de los árboles filogenéticos se hizo con Python v2.7.6 c ayuda el paquete ETE, en el cual se le adicionaron mediante comandos, los metadatos más importantes al árbol, lo que ayuda a una mejor visualización de los datos. Las características de interés de estos aislados se indican en los códigos de color incluidos en la parte superior derecha del árbol filogenético.

## 4.6 Caracterización de los microorganismos seleccionados

### 4.6.1 Caracterización Macroscópica y Microscópica

Los resultados de la caracterización macroscópica se presentan en la Tabla 8, mientras que la caracterización microscópica se muestra en la Tabla 9. En el Anexo 3 se encuentran las fotografías de la forma microscópica de cada una de las cepas.

**Tabla 8. Morfología colonial de los aislados bacterianos obtenidos de suelos contaminados con hidrocarburos y seleccionados, inicialmente, por su capacidad de crecer en altas concentraciones de antraceno (A) o fenantreno (F).**

ID	Caracterización Macroscópica							
	Forma	Elevación	Borde	Tamaño	Superficie	Consistencia	Color	Aspecto
<i>Sphingobium</i> sp. F5	Circular	Convexa Baja	Continuo	Mediano	Lisa	Blanda	Amarilla	Brillante
<i>Sphingobium</i> sp. F6	Puntiforme	Elevada	Continuo	Pequeño	Lisa	Blanda	Beige	Opaco
<i>Bosea</i> sp. F7	Puntiforme	Plana	Ondulado	Puntiforme	Lisa	Blanda	Transparente	Traslucido
<i>Pseudomonas</i> sp. A12	Filamentosa	Convexa Baja	Ondulado	Grande	Rugosa	Blanda	Blanca	Traslucido
<i>Rhodococcus</i> sp. A15	Circular	Elevada	Continuo	Grande	Lisa	Blanda	Blanca	Opaco
<i>Pseudomonas</i> sp. A17	Circular	Convexa	Continuo	Grande	Lisa	Dura	Amarilla	Brillante
<i>Phenylobacterium</i> sp. A19	Puntiforme	Plana	Continuo	Puntiforme	Lisa	Dura	Transparente	Traslucido

**Tabla 9. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y seleccionadas por su capacidad de crecer en altas concentraciones de antraceno (A) o fenantreno (F).**

ID	Caracterización Microscópica	
	Forma	Gram
<i>Sphingobium</i> sp. F5	Bacilos	-
<i>Sphingobium</i> sp. F6	Bacilos	-
<i>Bosea</i> sp. F7	Bacilos	-
<i>Pseudomonas</i> sp. A12	Bacilos	-
<i>Rhodococcus</i> sp. A15	Cocos	+
<i>Pseudomonas</i> sp. A17	Bacilos	-
<i>Phenylobacterium</i> sp. A19	Bacilos	-

#### 4.7 Establecimiento de consorcios bacterianos

De acuerdo con los resultados de las pruebas de antagonismo (Tablas 10 y 11), todas las bacterias presentaron crecimiento en los discos de confrontación. Por lo tanto, ninguna de las bacterias se inhibe entre sí.

**Tabla 10. Antagonismo entre bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y capaces de crecer con hasta 200 ppm de antraceno (A) como única fuente de carbono**

	<i>Pseudomonas</i> sp. A12	<i>Rhodococcus</i> sp. A15	<i>Pseudomonas</i> sp. A17	<i>Phenylobacterium</i> sp. A19
<i>Pseudomonas</i> sp. A12		+ <sup>1</sup>	+	+
<i>Rhodococcus</i> sp. A15	+		+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. A17	+	+		+
<i>Phenylobacterium</i> sp. A19	+	+	+	

<sup>1</sup>+ Indica crecimiento de las bacterias

**Tabla 11. Antagonismo entre bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos y capaces de crecer con hasta 200 ppm de fenantreno (F) como única fuente de carbono**

	<i>Sphingobium</i> sp. F5	<i>Sphingobium</i> sp. F6	<i>Bosea</i> sp. F7
<i>Sphingobium</i> sp. F5		+1	+
<i>Sphingobium</i> sp. F6	+		+
<i>Bosea</i> sp. F7	+	+	

<sup>1</sup>+ Indica crecimiento de las bacterias

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de las interacciones de las bacterias aisladas con A con respecto a las bacterias aisladas con F. Al igual que los ensayos anteriores, se observó que no tienen interacciones negativas entre sí.

Sobre la base de estos resultados, se establecieron dos consorcios microbianos que se encuentran conformados con cepas bacterianas que poseen las dos características de interés (alta resistencia a HAP y producción de biosurfactantes). El consorcio 1 se conformó por *Sphingobium* sp. [F5], *Bosea* sp. [F7] y *Rhodococcus* sp. [A15]. Mientras que el consorcio 2

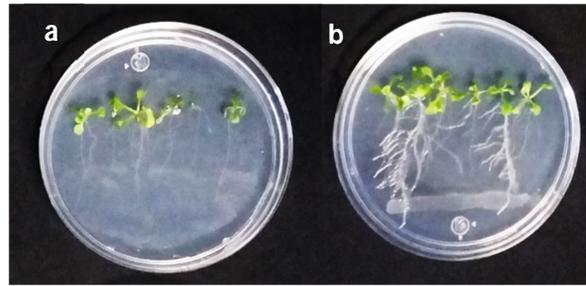
se conformó por *Sphingobium* sp. [F6], *Pseudomonas* sp. [A17] y *Phenylobacterium* sp. [A19].

**Tabla 12. Antagonismo entre los aislados bacterianos obtenidos de suelos contaminados con hidrocarburos y capaces de crecer con hasta 200 ppm de antraceno (A) o fenantreno (F) como única fuente de carbono.**

	<i>Pseudomonas</i> sp. A12	<i>Rhodococcus</i> sp. A15	<i>Pseudomonas</i> sp. A17	<i>Phenylobacterium</i> sp. A19	<i>Sphingobium</i> sp. F5	<i>Sphingobium</i> sp. F6	<i>Bosea</i> sp. F7
<i>Pseudomonas</i> sp. A12		+ <sup>1</sup>	+	+	+	+	+
<i>Rhodococcus</i> sp. A15	+		+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. A17	+	+		+	+	+	+
<i>Phenylobacterium</i> sp. A19	+	+	+		+	+	+
<i>Sphingobium</i> sp. F5	+	+	+	+		+	+
<i>Sphingobium</i> sp. F6	+	+	+	+	+		+
<i>Bosea</i> sp. F7	+	+	+	+	+	+	

<sup>1</sup>(+) Si hay crecimiento de las bacterias, lo cual representa una interacción positiva.

Además, en una investigación complementaria realizada en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Cinvestav-Unidad Irapuato, Ledesma-Hernández (2016) evaluó *in vitro* la capacidad de promoción de crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana* de los seis aislados seleccionados y los resultados indican que éstas bacterias ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas (Figura 9), lo cual las convierte en microorganismos promisorios para ser utilizados en procesos de fitorremediación. Estos resultados concuerdan con los reportados por Franchi y colaboradores (2016), quienes describieron la capacidad de promoción de crecimiento vegetal, *in vitro*, de bacterias capaces de degradar diferentes contaminantes orgánicos e inorgánicos, observando efectos positivos en la degradación de compuestos alqui aromáticos.



a) Control b) *Sphingobium* sp. F5

**Figura 9. Efecto de la inoculación de uno de los aislados bacterianos obtenido de suelos contaminados con hidrocarburos, sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.**

La bacteria mostrada (*Sphingobium* sp. [F5]) es capaz de crecer con hasta 200 ppm de fenantreno (F) como única fuente de carbono.

#### **4.8 Degradación de hidrocarburos en suelos**

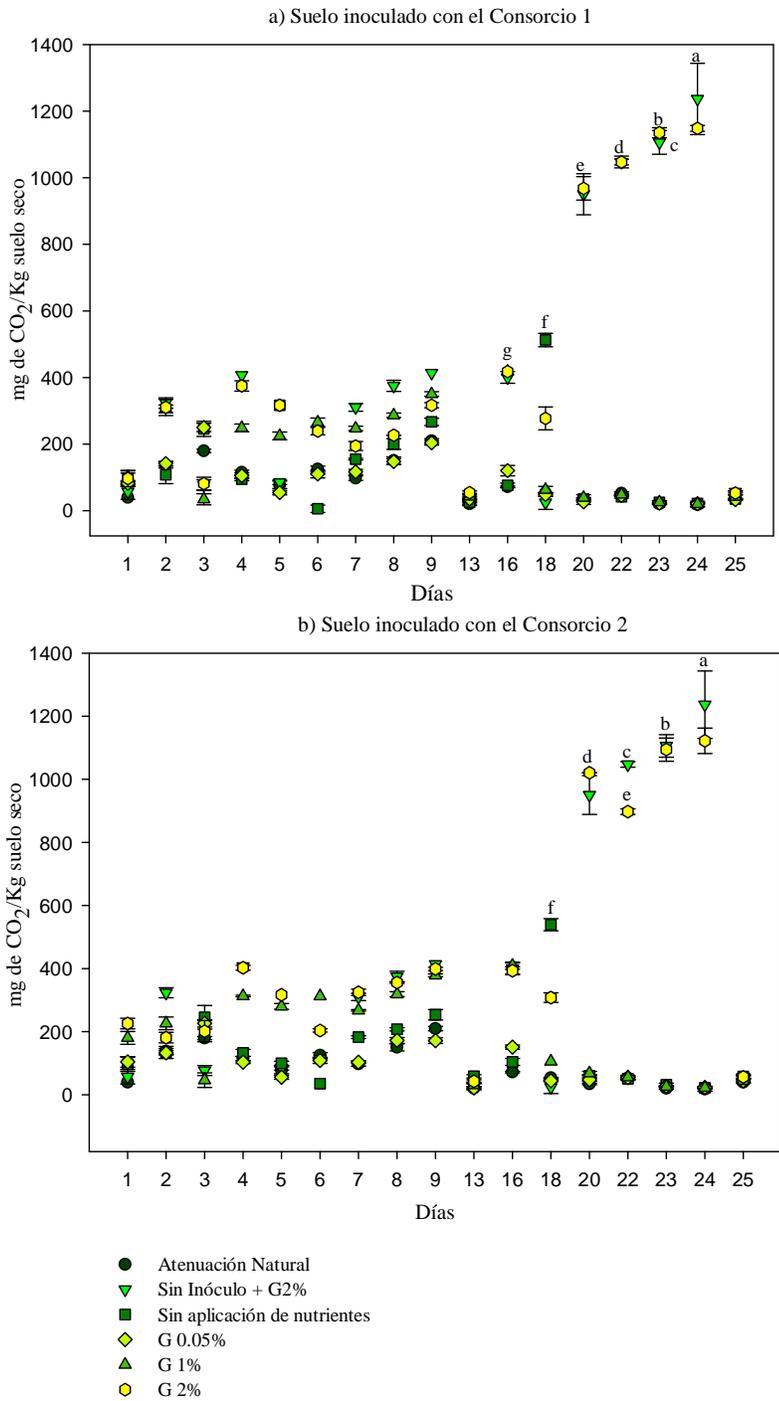
##### **4.8.1 Respiración en suelos**

Se realizaron pruebas de respiración de suelos para conocer si la población microbiana estaba asimilando a los hidrocarburos como fuente de energía y mediante esta evaluación, medir indirectamente la capacidad de degradarlos. Conocer la tasa de respiración microbiana en el suelo es de gran importancia, puesto que, con ayuda de los resultados de las concentraciones y eficiencias de remoción, puede tenerse un panorama que permita identificar las variables con las cuales se ve favorecida la degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo. Los análisis estadísticos de los datos se presentan en el Anexo 4.

La Figura 10 muestra los resultados de respiración en suelos contaminados inoculados con los consorcios C1 y C2 y aplicando concentraciones crecientes de glucosa. Como se puede observar, la respiración en el tratamiento de atenuación natural (AN) se mantiene constante a través del tiempo ( $85 \pm 57$  mg CO<sub>2</sub>/ kg s. s.). Esto puede presentarse debido a que los microorganismos presentes en el suelo están sujetos a un estímulo para presentar una respuesta. Se observa que AN presenta menor actividad respiratoria en comparación con los resultados obtenidos por la bioestimulación y/ o bioaumentación.

Por su parte se observa que en el tratamiento “Sin aplicación de nutrientes” hay un aumento en la respiración, tanto para C1 como para C2, que se puede diferenciar de la AN. El aumento es significativo desde el día 7 hasta el día 18, presentándose en este día la mayor respiración. Sin embargo, en el día 19 se observa una caída abrupta quedando el promedio igual al valor presentado por la AN. Se puede inferir que al agregar el consorcio que contiene células vivas hay un aumento de la población microbiana y por lo tanto, pueden presentarse cambios a nivel metabólico que generan un aumento en la disponibilidad de nutrientes (compuestos carbonados y nitrogenados) adjudicado a las bacterias inoculadas que producen biosurfactantes. Es posible que la disminución en la respiración se justifique al consumirse los nutrientes que se encuentran en el suelo de manera limitada, tal como lo observado es los estudios de Mora (2006).

Independientemente del inóculo, cuando se presenta una alta concentración de glucosa se observa un aumento en la respiración que va desde el día 16 hasta el día 24, presentado la caída hasta el nivel de atenuación natural el día 25. La adición de glucosa sin inóculos, aumenta la respiración de la microflora natural de suelo, llegando hasta 1400 mgCO<sub>2</sub>/kg suelo seco.

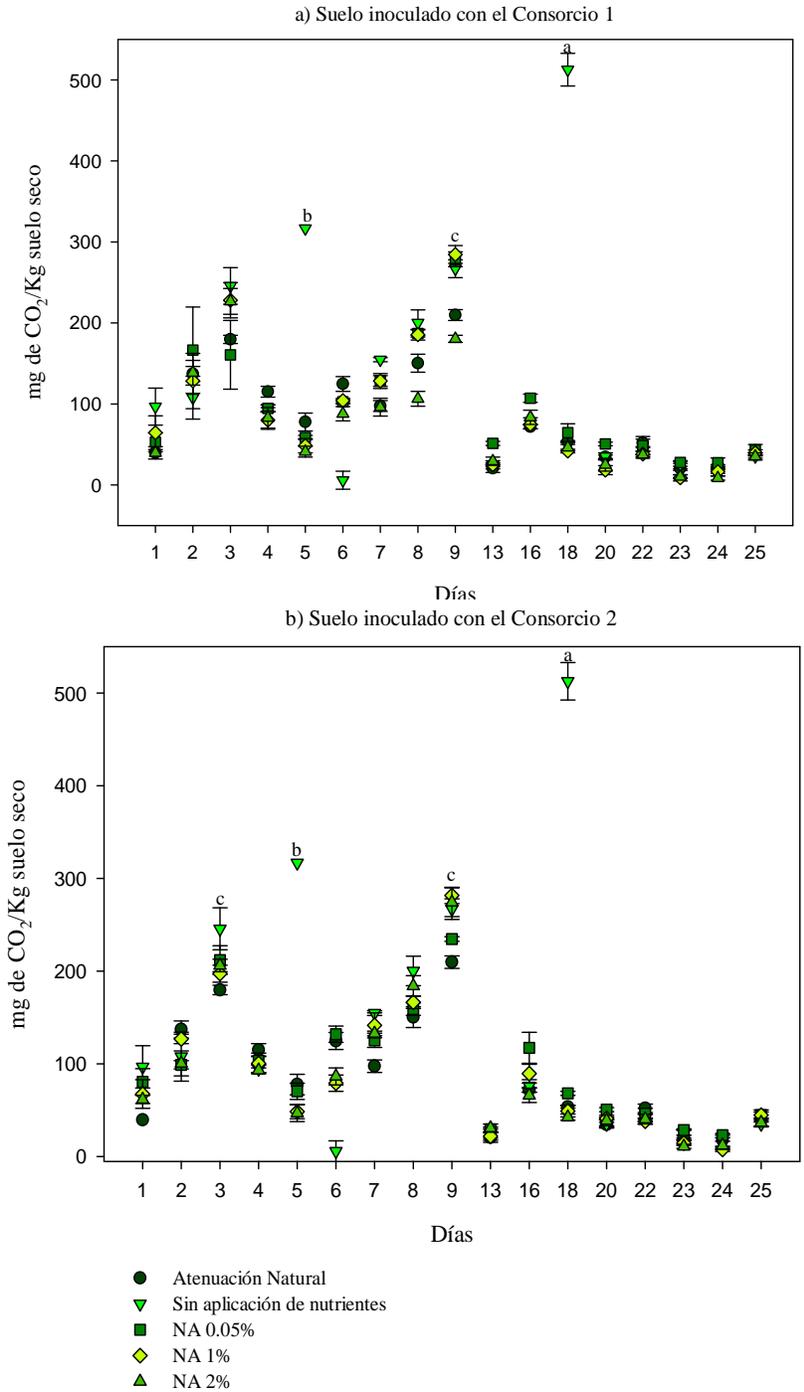


**Figura 10. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de glucosa en la respiración de suelo contaminado con petróleo inoculado con consorcios bacterianos.**

a) C1 y b) C2 (identificados mediante los símbolos mostrados en la parte inferior de la figura), compuestos por bacterias capaces de crecer en altas concentraciones de antraceno y fenantreno y/ o de producir biosurfactantes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (LSD  $p < 0.05$ ).

En la figura 11 se observa que en los tratamientos donde no se aplicaron nutrientes, las tasas de respiración fueron mayores en los días 3, 5, 9 y 18. No se observan cambios con respecto a los gradientes de adición de nitrato de amonio con excepción de los resultados del día 9, en donde se aprecia que la respiración aumentó en los tratamientos donde no se aplicó esta fuente de nitrógeno, y en donde se aplicó al 1% y al 2%, sin haber diferencias estadísticas significativas entre ellos. Esto se vincula a la degradación inmediata de las fracciones orgánicas lábiles presentes en el suelo, con la consecuente producción de energía para el crecimiento de los microorganismos inoculados (Rivero y Hernández, 2001),

Se aprecia la similitud del comportamiento de las tasas de respiración de los consorcios C1 y C2 en todos los casos de estudio (adición de glucosa, adición de nitrógeno o adición de glucosa y nitrógeno). Esto se puede explicar por la conformación de los dos consorcios, que si bien presentan géneros diferentes cada uno, éstos tienen capacidades metabólicas similares ya que en ambos consorcios se encuentran bacterias fijadoras de nitrógeno como los *Sphingoiium* [F5] y [F6], productoras de biosurfactantes como *Bosea* [F7] y *Phenylobacterium* [A19], y con amplia capacidad metabólica como *Pseudomonas* [A17] y *Rhodococcus* [A15].



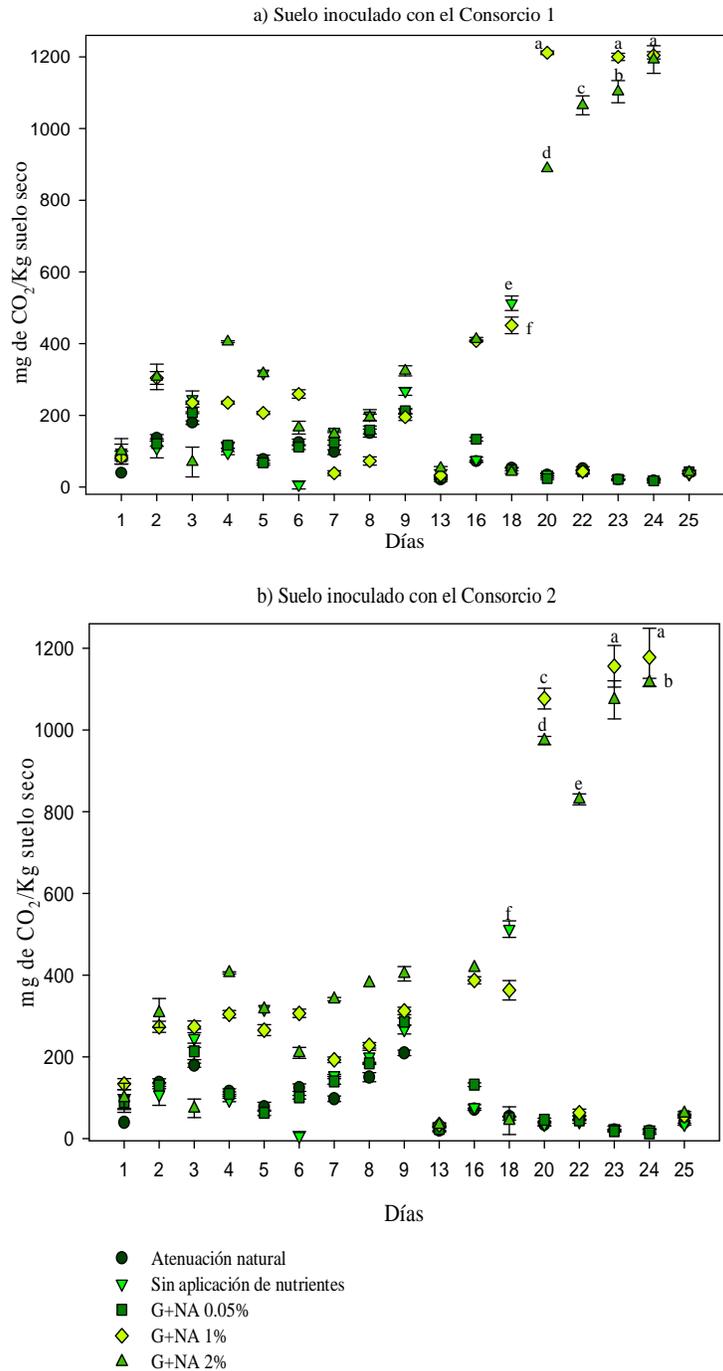
**Figura 11. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de nitrato de amonio en la respiración de suelo contaminado con petróleo inoculado con consorcios bacterianos**

a) C1 y b) C2 (identificados mediante los símbolos mostrados en la parte inferior de la figura), compuestos por bacterias capaces de crecer en altas concentraciones de antraceno y fenantreno y/ o de producir biosurfactantes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (LSD  $p < 0.05$ ).

En la figura 12 se observa que a partir del día 4 en el suelo inoculado con el C2, hay un aumento paulatino de la respiración del suelo hasta el día 16 en los tratamientos adicionados con glucosa y nitrato de amonio al 1% y al 2%. Mientras que en el consorcio 1, se observa este mismo patrón a excepción de los días 7 y 8 donde hay disminución de la respiración. A partir del día 18 y hasta el día 24, la respiración en los dos consorcios evaluados, aumentó 10 veces con respecto a la atenuación natural en los tratamientos de glucosa y amonio al 1% y 2%. A medida que transcurre la incubación, los sistemas comienzan a entrar en la etapa de estabilidad por cuanto el material recientemente añadido que es de fácil degradación comienza a agotarse y con ello el número de microorganismos disminuye al igual que el desprendimiento de CO<sub>2</sub> (Lerch et al., 1992).

#### **4.6.1 Cuantificación de la degradación de hidrocarburos**

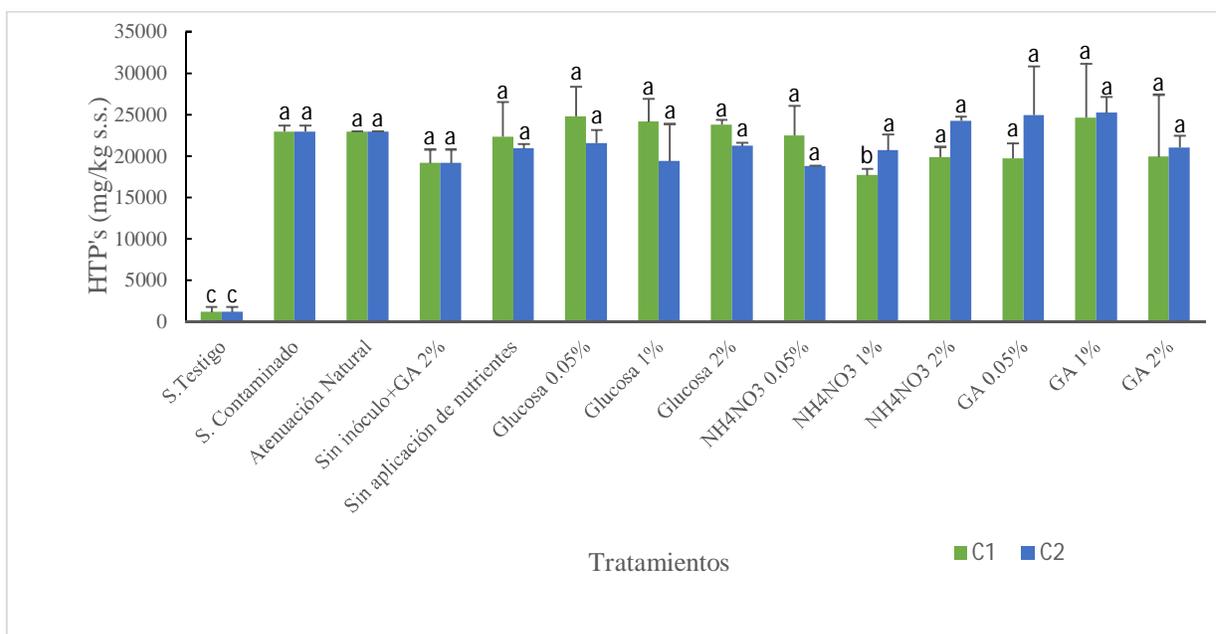
El suelo testigo contenía en promedio 1,172 HTP, siendo un buen control de suelo no contaminado. El suelo contaminado (SC) sobrepasó en 3.8 veces al límite máximo permisible de 6000 HTP establecido por la NOM 138 SEMARNAT 2012. Los análisis estadísticos de los datos que se presentan en la siguiente figura se encuentran en el Anexo 5.



**Figura 12. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de nitrato de amonio y glucosa en la respiración de suelo contaminado con petróleo inoculado con consorcios bacterianos**

a) C1 y b) C2 (identificados mediante los símbolos mostrados en la parte inferior de la figura), compuestos por bacterias capaces de crecer en altas concentraciones de antraceno y fenantreno y/ o de producir biosurfactantes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (LSD  $p < 0.05$ ).

Como se observa en la Figura 13, entre la atenuación natural (AN) y el suelo contaminado (SC) no se presentaron diferencias estadísticas significativas, siendo que el primer tratamiento no presentó ninguna remoción de hidrocarburos. Esto puede ser debido a que el proceso es más lento y menos efectivo en comparación con los resultados obtenidos por la incorporación de nutrientes al suelo y/o aumentación de la microflora nativa.



**Figura 13. Efecto de la bioestimulación en la degradación de HTP de suelo contaminado inoculado con los consorcios C1 y C2 y complementado con diversas fuentes adicionales de carbono (i.e. glucosa, [G]) y/ o nitrógeno (i.e., nitrato de amonio, [A]).**

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (LSD  $p < 0.05$ ).

La inoculación del suelo con el C1 (*Sphingobium* sp. [F5], *Bosea* sp. [F7] y *Rhodococcus* sp. [A15]), junto con la adición de nitrato de amonio al 1% fue el tratamiento que presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles de SC y AN. Resultó, además, el mejor tratamiento ya que en 25 días removi6 el 23% de los HTP, es decir que redujo los HTP de 23,000 mg/ kg s. s. a 17,600. El porcentaje de degradación observado pudo ser causado por la mayor solubilidad y disponibilidad de los nutrientes en el suelo tanto para los microorganismos nativos (Wrenn y Venosa, 1996) como para los microorganismos inoculados (bioaumentación).

El tratamiento donde se inoculó al suelo con el C1 y se le adicionó nitrato de amonio al 1% no fue estadísticamente diferente al tratamiento donde también fue inoculado el C1 pero sin nutrientes. Esto indica que probablemente la remoción obtenida por este tratamiento es atribuida a la inoculación del C1 (bioaumentación) más que a la adición del nitrato de amonio al 1%. Se ha reportado que la bioestimulación no siempre incrementa los porcentajes de degradación de HTP, debido a que otros factores pueden limitar la actividad microbiana o interactuar con los nutrientes, disminuyendo la tasa de degradación. Algunos factores que han sido identificados son valores bajos de pH (< 5.0), bajo porcentaje de humedad, concentración de los HTP (fracciones de difícil degradación), temperatura y biodisponibilidad, entre otros (Margesin y Schinner, 2001; Vallejo *et al.*, 2005; Speight, 2014). En este respecto, las fracciones de difícil degradación fueron las que tuvieron el mayor impacto en este estudio, pues el suelo utilizado contiene petróleo intemperizado que contiene compuestos recalcitrantes (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005), como hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Rivera *et al.*, 2002), asfaltenos y resinas (Fernández *et al.*, 2006).

A pesar de que no se observaron diferencias significativas con respecto a la AN, el tratamiento donde el suelo fue inoculado con C2 (compuesto por *Sphingobium* sp. [F6], *Pseudomonas* sp. [A17] y *Phenylobacterium* sp. [A19]) y adicionado con nitrato de amonio al 0.05%” presentó 18% de remoción, disminuyendo los HTP, de 23,000 mg/ kg s. s. a 18,700.

Por otra parte, el tratamiento “Sin inóculo + Glucosa al 2%” redujo el 16% de los HTP. Esto se atribuye a que hay microorganismos nativos en este suelo contaminado con petróleo intemperizado, que ya están adaptados a estas condiciones adversas y que además tienen la capacidad de degradar estos hidrocarburos, ya que la tolerancia microbiana a la presencia de petróleo en el suelo induce la selectividad. Los microorganismos tolerantes a este ambiente de estrés, desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas *et al.*, 1991). Se sabe que las poblaciones hidrocarbonoclastas son particularmente abundantes en los suelos aledaños a tanques de almacenamiento, pozos petroleros y en los resumideros naturales de petróleo (Levorsen, 1967). La adición de glucosa al 2% pudo intervenir como

un “iniciador” para que los microorganismos nativos empezaran a multiplicarse y a degradar parte de los hidrocarburos disponibles, ya que la adición de nutrientes en ambientes contaminados permite una degradación más rápida y eficaz de los hidrocarburos por parte de los microorganismos nativos (Margesin y Schinner, 2001)

En general, no se encontraron más diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos establecidos con C1 y C2 y la estimulación de las bacterias nativas del suelo. Sin embargo, los resultados obtenidos han permitido establecer cuál es el mejor tratamiento para cada inóculo, con lo que a mediano plazo se pueden llevar a cabo experimentos donde se combinen la bioestimulación y la bioaumentación con el fin de aumentar la eficiencia de degradación.

Los mayores porcentajes de remoción se presentaron en los tratamientos C1 + nitrato de amonio al 1%, C2 + nitrato de amonio al 0.05% y “Sin inóculo” + glucosa al 2%, por lo cual se esperaba que la emisión de CO<sub>2</sub> fuera mayor en dichos tratamientos. La tasa de respiración en el suelo resultó muy variada. La respiración reportada para cada uno de estos tratamientos puede ser justificada por la población microbiana que habita en el suelo, considerando que no todos los microorganismos presentes en el suelo desempeñan una actividad metabólica favorecedora para la biodegradación de hidrocarburos.

## V. CONCLUSIONES

El suelo bajo estudio sobrepasa el límite máximo permisible de HTP establecido en la legislación mexicana, e indica la gravedad de los derrames en la zona de muestreo.

De los aislados bacterianos encontrados en la zona de estudio, la gran mayoría corresponde a bacterias Gram - y muestran resistencia a compuestos como el antraceno y fenantreno, así como la producción de biosurfactantes y fijación de nitrógeno. Más de la mitad de los aislados correspondieron a géneros del phylum Alphaproteobacteria, siendo el género *Sphingobium* el que predominó. Por su parte, el género *Pseudomonas* fue el más representativo dentro del phylum Gammaproteobacteria.

Los aislados que fueron resistentes a HAP y que además produjeron biosurfactantes fueron identificados como *Sphingobium* sp., *Bosea* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. y *Phenylobacterium* sp. Estos géneros han sido reportados como degradadores de contaminantes orgánicos.

El consorcio 1 conformado por *Sphingobium* sp. [F5], *Bosea* sp. [F7] y *Pseudomonas* sp. [A17], aunado a la adición de nitrato de amonio al 1%, en un período de 25 días, redujo 23% del contenido de HTP en el suelo contaminado con petróleo intemperizado. Esto muestra que es posible mejorar el rendimiento de las alternativas biológicas de remediación que implican, tanto el uso de bacterias nativas del suelo contaminado como las condiciones nutrimentales del suelo.

## **VI. PERSPECTIVAS**

1. Realizar ensayos de degradación de hidrocarburos, conservando las mismas condiciones, utilizando cromatografía de gases como método de identificación analítica de HAP.
2. Caracterizar el tipo de biosurfactante producido por las bacterias, incluyendo el análisis de la estructura química, índice de emulsión, actividad detergente y tensioactiva, así como la posibilidad de ser producido en gran escala.
3. Desarrollar ensayos de fitorremediación empleando plantas que se encuentran adaptadas a condiciones de suelo contaminado con petróleo intemperizado en el estado de Tabasco, como lo son el pasto japonés (*Lersia* sp.) y plántulas de tulillo (*Cyperus articulatus*), adicionadas con los consorcios C1 y C2

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams S.R.H., Domínguez RVI, García HL (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra* 17(2) 159-174.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Segunda edición, Academic Press. San Diego.
- Al-Mailem, D. M., Kansour, M. K., Radwan, S. S. (2014). Bioremediation of hydrocarbons contaminating sewage effluent using man-made biofilms: effects of some variables. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(5), 1736-1751.
- Arias Trinidad, A. (2012). La ecotoxicidad y el pasto japonesa (*Leersia sp.*) en la fitorremediación de un Gleysol contaminado con petróleo fresco, intemperizado y sulfatos. [en línea] [http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/1762/Arias\\_Trinidad\\_A\\_MC\\_Produccion\\_Agroalimentaria\\_Tropico\\_2012.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/1762/Arias_Trinidad_A_MC_Produccion_Agroalimentaria_Tropico_2012.pdf?sequence=1) (Revisado: 15 de agosto de 2015).
- Atlas, R. M., Horowitz, A., Krichevsky, M., Bej, A. K. (1991). Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology*, 22(1), 249-256.
- Barnes, D. L. (2003). Estimation of operation time for soil vapor extraction systems. *Journal of Environmental Engineering*, 129(9), 873-878.
- Bodour, A. A., y Maier, R. M. (2003). Biosurfactants: Types, Screening Methods, and Applications. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. New York: Wiley. 750-770.
- Botello, A. V. (2005). Características composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 261-268.
- Castillo-Rodríguez, F., Roldán Ruiz M.D., Blasco P., Huertas M.J., Caballero F.J., Moreno D.C., Luque M.M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tébar. Madrid, España. 359-378, 616 p.
- Clark, R. C., y Brown, D. W. (1977). Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems. *Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms*, (1), 1-89.

Clements, W. H., Oris, J. T., Wissing, T. E. (1994). Accumulation and food chain transfer of fluoranthene and benzo [a] pyrene in *Chironomus riparius* and *Lepomis macrochirus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(3), 261-266.

Cortés-Camargo, S., y Barragán-Huerta, B. (2013). Producción de biosurfactantes por microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 6(1), 1-8.

Estratégica. (2011). Tabasco: Producción petrolera en la Tierra. [en línea] <http://www.cumbre.com.mx/estudios/ago0111.pdf> (Revisado: 30 de junio de 2016)

Fernández, C., Silva, M., Pereira, J. C., Mallia, A., Llobregat, M. J., Altomare, V. (2006). Biodegradabilidad de las fracciones de resinas y asfaltenos por *Pseudomonas* en suelo impactado con crudo mediano. *Ingeniería UC*, 13(2), 7-13.

Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.

Franchi, E., Agazzi, G., Rolli, E., Borin, S., Marasco, R., Chiaberge, S., Barbaferi, M. (2016). Exploiting hydrocarbon-degrader indigenous bacteria for bioremediation and phytoremediation of a multi-contaminated soil. *Chemical Engineering & Technology*. 39(9), 1676-1684.

Haritash, A., y Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1), 1-15.

Khan, F. I., Husain, T., Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71(2), 95-122.

Keith, L., y Telliard, W. (1979). ES&T special report: priority pollutants: Ia perspective view. *Environmental Science & Technology*, 13(4), 416-423.

Koukkou, A. I., y Vandera, E. (2011). Hydrocarbon-degrading soil bacteria: current research. *Microbial bioremediation of non-metals: current research*. Caister Academic Press, Norfolk, 93-117.

Ledesma-Hernández J. (2016). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal aisladas de suelo contaminado con petróleo y su efecto en *Arabidopsis thaliana* (tesis de pregrado) Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato.

Lerch, R. N., Barbarick, K. A., Sommers, L. E., Westfall, D. G. (1992). Sewage sludge

proteins as labile carbon and nitrogen sources. *Soil Science Society of America Journal*, 56(5), 1470-1476.

Levorsen, A. I. (1967). *Geology of petroleum* (p. 724). F. A. F. Berry (Ed.). San Francisco: WH Freeman.

Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. (1998). Brock. Biología de los microorganismos. 8a. ed. rev. y aum. Trad. al español por M. Gacto F., I. García A., T. González V., R. Guerrero M. y M. Sánchez P. Prentice Hall Iberia. Madrid, España.

Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M. C., Izquierdo-Reyes, F., Palma-López, D. J. (2010). Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y ciencia*, 26(2), 121-136.

Maletić, S. P., Dalmacija, B. D., Rončević, S. D., Agbaba, J. R., Perović, S. D. U. (2011). Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46(10), 1042-1049.

Mandri, T., y Lin, J. (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6(1), 23-27.

Margesin, R., y Schinner, F. (2001). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3127-3133.

Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores Biológicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 39(1), 27-36.

Martínez, V. y López, F. (2001). Efectos de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso. *Terra* 19(1), 9-17.

Mohsenzade, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D. y Chehregani, A. (2009). Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheric fungi. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91 (8) 1443-1453.

Mora, J. (2006). La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. *Revista Luna azul*, 5(6), 1-6.

Moreno, D. R. (1978). Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrientes asimilables. *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Secretaría de Agricultura y*

*Recursos Hidráulicos. México, DF.*

Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1488(3):211-218.

Mulligan, C. N., (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), p. 183–98.

Nedunuri, K. V., Govindaraju, R. S., Banks, M. K., Schwab, A. P., Chen, Z. (2000). Evaluation of phytoremediation for field-scale degradation of total petroleum hydrocarbons. *Journal of Environmental Engineering*, 126(6), 483-490.

Olson, R.V., R. Ellis Jr., G.W. Kunze y J. Dixon. (1982). Chemical and microbiological properties. Pp. 149-157, 167-178, 534-577, 815-820. *In: Methods of soils analysis (Part 2)*. 2nd ed. American Society of agronomy. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.

OMI, (Organización Marítima Internacional). (2005). Manual sobre la contaminación ocasionada por los hidrocarburos: parte IV, *Lucha contra los derrames de hidrocarburos*. 2ª ed. Northampton, Reino Unido. 226 p.

Park, K. S., Sims, R. C., Dupont, R. R. (1990). Transformation of PAHs in soil systems. *Journal of Environmental Engineering*, 116(3), 632-640.

PEMEX, Petróleos Mexicanos (2009). Boletines regionales. [en línea].

[http://www.pemex.com/files/content/tabasco\\_0903271.pdf](http://www.pemex.com/files/content/tabasco_0903271.pdf) (Revisado: 1 de agosto 2015).

Petrikov, K., Delegan, Y., Surin, A., Ponamoreva, O., Puntus, I., Filonov, A., Boronin, A. (2013). Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. *Process Biochemistry*, 48(5), 931-935.

Phale, P. S., Basu, A., Majhi, P. D., Deveryshetty, J., Vamsee-Krishna, C., Shrivastava, R. (2007). Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 11(3), 252-279.

Pons-Jiménez, M., Guerrero-Peña, A., Zavala-Cruz, J., Alarcón, A. (2011). Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. *Universidad y Ciencia*, 27(1), 1-15.

PROFEPA (2011). Análisis Nacional de Emergencias Ambientales [en línea]. [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/211/1/mx/analisis\\_nacional\\_de\\_emergencias\\_a](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/211/1/mx/analisis_nacional_de_emergencias_a)

mbientales.html. (Revisado: 01 de febrero de 2015).

Pérez, R., Terrón, T. S., Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1(3), 53-60.

Rivera-Cruz, M., y Trujillo-Narcía, A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29(7):369-376.

Rivera-Cruz, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., Fernández, L. (2002). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana*, 20(4), 423-434.

Rivero, C. y E. Hernández. (2001). Efecto de la aplicación de dos tipos de compost en la evolución de CO<sub>2</sub> y la actividad de fosfatasa en un suelo inceptisol. *Venesuelos* 9(1), 24-32.

Sen, R. (2010). Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications. In *Biosurfactants* pp. 316-323. Springer New York.

Siebe, C., y Jahn, R. (1996). *Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo* (No. Folleto 15842). México: Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.

Speight, J. G. (2014). *The chemistry and technology of petroleum*. CRC press.

Stotzky, G. (1965). Microbial respiration. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 1550-1572.

Srogi K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 5(4),169-195.

Sulbarán M., Bahsas A., Velásquez W y Rojas J. (2005). Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia*. 13(2). 228-239.

Trujillo-Narcía, A., Rivera-Cruz, M. D. C., Lagunes-Espinoza, L. D. C., Palma-López, D. J., Soto-Sánchez, S., Ramírez-Valverde, G. (2012). Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(4), 360-374.

Trujillo-Narcia A., Zavala C.J., Lagunes E.L.C. (1995) Contaminación de suelos por metales pesados e hidrocarburos aromáticos en Tabasco. In: Memoria Octava Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria. INIFAP Tabasco. Villahermosa, Tab. pp. 45-52.

Urum, K., Pekdemir, T., Gopur, M. (2003). Optimum conditions for washing of crude oil-

contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection*, 81(3), 203-209.

US EPA-3540B. (1996). Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. [en línea]. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>. (Revisado: 20 Junio de 2016).

Vallejo, V., Salgado, L., y Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 67-78.

Wrenn, B. A., y Venosa, A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 252-258.

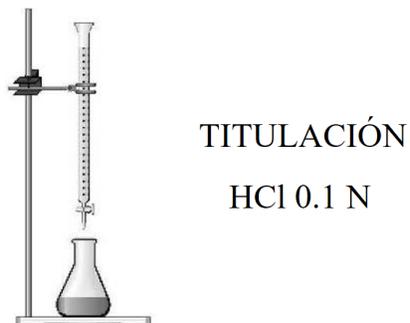
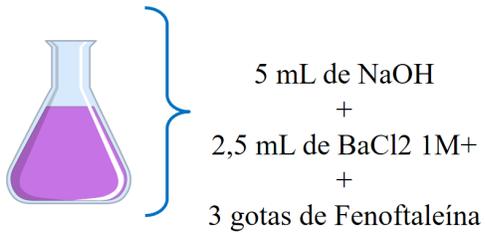
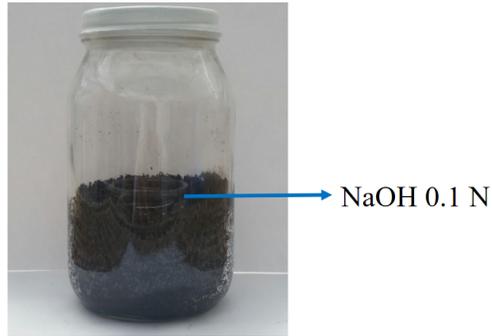
Xie, C. H., y Yokota, A. (2006). *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(4), 889-893.

Zylstra, G. J., y Kim, E. (1997). Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5-6), 408-414.

# ANEXOS

## Anexo 1.

### Esquema del Ensayo de Respiración de Suelos

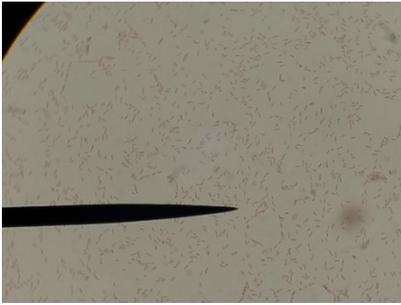


## Anexo 2.

### Morfología colonial y caracterización microscópica de las bacterias aisladas

ID	Forma colonial	Elevacion	Borde	Tamaño	Superficie	Consistencia	Color	Aspecto	Forma celular	Gram
F1	Puntiforme	Plana	Entero	Puntiforme	Lisa	Blanda	Beige	Brillante	Bacilo	-
F2	Circular	Plana	Entero	Grande	Lisa	Blanda	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F3	Circular	Plana	Entero	Pequeño	Lisa	Blanda-Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F4	Circular	Plana	Entero	Grande	Lisa	Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F5	Circular	Convexa Baja	Entero	Grande	Lisa	Blanda	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F6	Circular	Convexa Baja	Entero	Grande	Lisa	Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F7	Puntiforme	Plana	Entero	Puntiforme	Lisa	Blanda	Beige	Brillante	Bacilo	-
F8	Circular	Plana	Entero	Mediano	Lisa	Blanda	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F9	Circular	Plana	Entero	Pequeño	Lisa	Blanda-Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F10	Circular	Plana	Entero	Mediano	Lisa	Blanda	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
F11	Circular	Plana	Entero	Grande	Lisa	Mucoide	Beige	Opaco	Bacilo curvo	-
A1	Rizoide	Elevada	Ondulado	Grande	Rugosa	Dura	Beige	Opaco	Bacilo	-
A2	Circular	Elevada	Entero	Mediano	Lisa	Blanda	Naranja	Brillante	Bacilo corto	+
A3	Puntiforme	Plana	Entero	Puntiforme	Lisa	Blanda-Mucoide	Rosa	Opaco	Bacilo	-
A4	Circular	Elevada	Entero	Grande	Lisa	Mucoide	Naranja	Opaco	Bacilo	-
A5	Circular	Elevada	Entero	Grande	Lisa	Mucoide	Naranja	Brillante	Bacilo	-
A6	Circular	Elevada	Entero	Mediano	Lisa	Blanda	Beige	Brillante	Bacilo	-
A7	Circular	Plana	Entero	Pequeño	Lisa	Blanda	Beige	Brillante	Bacilo	-
A8	Circular	Convexa Baja	Entero	Pequeño	Lisa	Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo corto	-
A9	Circular	Elevada	Entero	Pequeño	Lisa	Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
A10	Puntiforme	Plana	Entero	Puntiforme	Lisa	Mucoide	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
A11	Puntiforme	Elevada	Entero	Puntiforme	Lisa	Dura	Beige	Brillante	Bacilo	-
A12	Circular	Elevada	Entero	Mediano	Lisa	Mucoide	Beige	Opaco	Bacilo	-
A13	Filamentosa	Elevada	Entero	Grande	Lisa	Mucoide	Beige	Brillante	Bacilo	-
A14	Circular	Elevada	Entero	Mediano	Lisa	Blanda	Beige	Brillante	Bacilo	-
A15	Circular	Plana	Entero	Grande	Lisa	Blanda-Mucoide	Blanco	Brillante	Bacilo corto	+
A16	Filamentosa	Elevada	Entero	Grande	Rugosa	Mucoide	Beige	Opaco	Bacilo	-
A17	Circular	Plana	Entero	Mediano	Rugosa	Dura	Beige	Opaco	Bacilo	-
A18	Circular	Elevada	Entero	Mediano	Lisa	Mucoide	Beige	Opaco	Bacilo	-
A19	Circular	Plana	Entero	Mediano	Lisa	Dura	Beige	Opaco	Bacilo	-

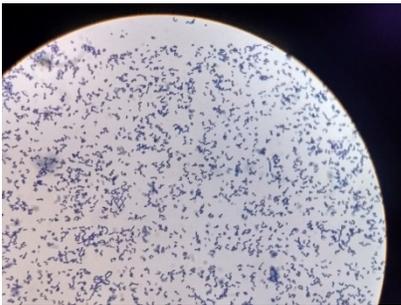
### Anexo 3. Fotografías Microscópicas de los aislados



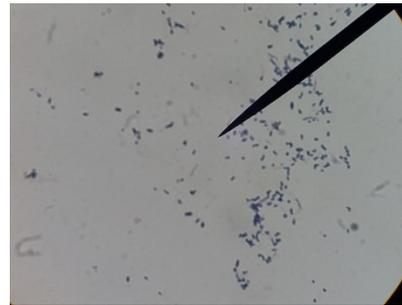
*Pseudomonas* sp. A12 Bacilos Gram-



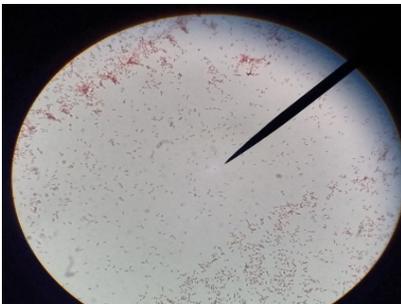
*Sphingobium* sp. F5 Bacilos Gram-



*Rhodococcus* sp. A15 Cocos Gram+



*Rhodococcus* sp. A2 Cocos Gram+



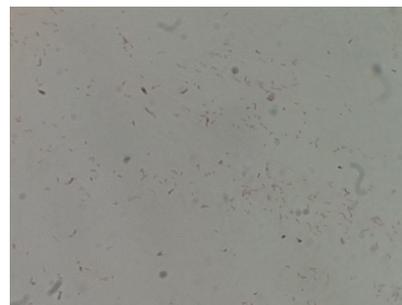
*Pseudomonas* sp. A17 Bacilos Gram-



*Phenylobacterium* sp. A19 Bacilos Gram-



*Sphingobium* sp. F6 Bacilos Gram-



*Bosea* sp. F7 Bacilos Gram-

## Anexo 4. Análisis estadísticos Respiración de suelos

### Adición de concentraciones crecientes de Glucosa (Bioestimulación) al suelo contaminado inoculado con C1

Análisis de varianza  
(mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	101	23933487.614	236965.224	799.407	< 0.0001
Error	204	60470.960	296.426		
Total corregido	305	23993958.574			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Días	16	3866400.183	241650.011	815.211	< 0.0001
Tratamiento	5	6405897.948	1281179.590	4322.085	< 0.0001
Días*Tratamiento	80	13661189.483	170764.869	576.079	< 0.0001

**Días\*Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (mg/CO<sub>2</sub>):**

Categoría	Me LS	Grupos			
-Día 24*-Sin inóculo + Glucosa 2%	1236.4	A			
-Día 24*-C1+Glucosa 2%	1148.4	B			
-Día 23*-C1+Glucosa 2%	1135.2	B			
-Día 23*-Sin inóculo + Glucosa 2%	1105.9	C			
-Día 22*-Sin inóculo + Glucosa 2%	1047.2	D			
-Día 22*-C1+Glucosa 2%	1047.2	D			
-Día 20*-C1+Glucosa 2%	968.0	E			
-Día 20*-Sin inóculo + Glucosa 2%	950.4	E			
-Día 18*-C1- Sin aplicación de nutrientes	512.6	F			
-Día 16*-C1+Glucosa 2%	418.0	G			
-Día 16*-C1+Glucosa 1%	418.0	G			
-Día 9*-Sin inóculo + Glucosa 2%	413.6	G			
-Día 4*-Sin inóculo + Glucosa 2%	407.0	G			
-Día 16*-Sin inóculo + Glucosa 2%	400.4	G	H		
-Día 8*-Sin inóculo + Glucosa 2%	374.7	H	I		
-Día 4*-C1+Glucosa 2%	374.7	H	I		
-Día 9*-C1+Glucosa 1%	350.5	I	J		
-Día 2*-Sin inóculo + Glucosa 2%	323.4	J	K		
-Día 5*-C1- Sin aplicación de nutrientes	316.8	K			
-Día 5*-C1+Glucosa 2%	316.8	K			
-Día 9*-C1+Glucosa 2%	316.8	K			
-Día 2*-C1+Glucosa 2%	310.2	K	L		
-Día 7*-Sin inóculo + Glucosa 2%	310.2	K	L		
-Día 2*-C1+Glucosa 1%	305.8	K	L		
-Día 8*-C1+Glucosa 1%	286.7	L	M		
-Día 18*-C1+Glucosa 2%	277.2	M	N		
-Día 9*-C1- Sin aplicación de nutrientes	266.9	M	N	O	
-Día 6*-C1+Glucosa 1%	265.5	M	N	O	P



-Día 25*-C1- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AN	AO	AP	AQ	AR	AS
-Día 20*-C1- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AN	AO	AP	AQ	AR	AS
-Día 3*-C1+Glucosa 1%	34.5	AN	AO	AP	AQ	AR	AS
-Día 20*-Atenuación Natural	34.5	AN	AO	AP	AQ	AR	AS
-Día 25*-C1+Glucosa 0.05%	33.0	AN	AO	AP	AQ	AR	AS AT
-Día 20*-C1+Glucosa 0.05%	26.4	AO	AP	AQ	AR	AS	AT
-Día 23*-C1+Glucosa 1%	25.7	AP	AQ	AR	AS	AT	
-Día 13*-C1- Sin aplicación de nutrientes	24.9	AQ	AR	AS	AT		
-Día 23*-C1- Sin aplicación de nutrientes	24.9	AQ	AR	AS	AT		
-Día 18*-Sin inóculo + Glucosa 2%	24.2	AR	AS	AT			
-Día 23*-C1+Glucosa 0.05%	22.7	AR	AS	AT			
-Día 24*-C1- Sin aplicación de nutrientes	21.6	AR	AS	AT			
-Día 24*-C1+Glucosa 0.05%	20.9	AR	AS	AT			
-Día 13*-Atenuación Natural	20.5	AS	AT				
-Día 23*-Atenuación Natural	20.5	AS	AT				
-Día 24*-C1+Glucosa 1%	20.2	AS	AT				
-Día 24*-Atenuación Natural	18.0	AS	AT				
-Día 6*-C1- Sin aplicación de nutrientes	5.9	AT					

### Adición de concentraciones crecientes de Glucosa (Bioestimulación) al suelo contaminado inoculado con C2

Análisis de varianza  
(mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	101	22930312.298	227032.795	744.295	< <b>0.0001</b>
Error	204	62226.267	305.031		
Total corregido	305	22992538.564			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Días	16	3626782.191	226673.887	743.118	< <b>0.0001</b>
Tratamiento	5	6628408.028	1325681.606	4346.059	< <b>0.0001</b>
Días*Tratamiento	80	12675122.079	158439.026	519.420	< <b>0.0001</b>

### Días\*Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (mg/CO<sub>2</sub>):

Categoría	Media	Grupos
-Día 24*-Sin inóculo + Glucosa 2%	1236.4	A
-Día 24*-C2+Glucosa 2%	1122.0	B
-Día 23*-Sin inóculo + Glucosa 2%	1105.9	B
-Día 23*-C2+Glucosa 2%	1094.1	B
-Día 22*-Sin inóculo + Glucosa 2%	1047.2	C
-Día 20*-C2+Glucosa 2%	1020.8	C
-Día 20*-Sin inóculo + Glucosa 2%	950.4	D

-Día 22*-C2+Glucosa 2%	897.6	E							
-Día 18*-C2- Sin aplicación de nutrientes	539.0	F							
-Día 9*-Sin inóculo + Glucosa 2%	413.6	G							
-Día 16*-C2+Glucosa 1%	409.2	G							
-Día 4*-Sin inóculo + Glucosa 2%	407.0	G							
-Día 4*-C2+Glucosa 2%	402.6	G	H						
-Día 16*-Sin inóculo + Glucosa 2%	400.4	G	H						
-Día 9*-C2+Glucosa 2%	398.9	G	H						
-Día 16*-C2+Glucosa 2%	393.1	G	H						
-Día 9*-C2+Glucosa 1%	378.4	H	I						
-Día 8*-Sin inóculo + Glucosa 2%	374.7	H	I						
-Día 8*-C2+Glucosa 2%	355.7	I							
-Día 7*-C2+Glucosa 2%	324.9	J							
-Día 2*-Sin inóculo + Glucosa 2%	323.4	J							
-Día 8*-C2+Glucosa 1%	319.0	J							
-Día 5*-C2+Glucosa 2%	316.8	J							
-Día 4*-C2+Glucosa 1%	313.1	J							
-Día 6*-C2+Glucosa 1%	312.4	J							
-Día 7*-Sin inóculo + Glucosa 2%	310.2	J							
-Día 18*-C2+Glucosa 2%	308.0	J	K						
-Día 5*-C2+Glucosa 1%	280.1	K	L						
-Día 7*-C2+Glucosa 1%	267.7	L	M						
-Día 9*-C2- Sin aplicación de nutrientes	253.7	L	M	N					
-Día 3*-C2- Sin aplicación de nutrientes	245.7	M	N						
-Día 2*-C2+Glucosa 1%	226.6	N	O						
-Día 3*-C2+Glucosa 0.05%	226.6	N	O						
-Día 1*-C2+Glucosa 2%	225.9	N	O						
-Día 9*-Atenuación Natural	209.7	O	P						
-Día 8*-C2- Sin aplicación de nutrientes	207.5	O	P	Q					
-Día 6*-C2+Glucosa 2%	203.9	O	P	Q					
-Día 3*-C2+Glucosa 2%	201.7	O	P	Q					
-Día 7*-C2- Sin aplicación de nutrientes	182.6	P	Q	R					
-Día 2*-C2+Glucosa 2%	181.1	Q	R						
-Día 1*-C2+Glucosa 1%	180.4	Q	R						
-Día 3*-Atenuación Natural	179.7	Q	R						
-Día 8*-C2+Glucosa 0.05%	172.3	R	S						
-Día 9*-C2+Glucosa 0.05%	171.6	R	S						
-Día 16*-C2+Glucosa 0.05%	151.1	S	T						
-Día 8*-Atenuación Natural	150.3	S	T						
-Día 2*-Atenuación Natural	137.1	T	U						
-Día 2*-C2- Sin aplicación de nutrientes	134.2	T	U	V					
-Día 2*-C2+Glucosa 0.05%	132.7	T	U	V	W				
-Día 4*-C2- Sin aplicación de nutrientes	132.7	T	U	V	W				
-Día 6*-Atenuación Natural	124.7	T	U	V	W	X			
-Día 4*-Atenuación Natural	115.1	U	V	W	X				
-Día 6*-Sin inóculo + Glucosa 2%	114.4	U	V	W	X				
-Día 6*-C2+Glucosa 0.05%	108.5	V	W	X	Y				
-Día 18*-C2+Glucosa 1%	105.6	W	X	Y	Z				
-Día 1*-C2+Glucosa 0.05%	104.1	X	Y	Z	AA				
-Día 16*-C2- Sin aplicación de nutrientes	104.1	X	Y	Z	AA				
-Día 7*-C2+Glucosa 0.05%	103.4	X	Y	Z	AA				
-Día 4*-C2+Glucosa 0.05%	103.4	X	Y	Z	AA				
-Día 5*-C2- Sin aplicación de nutrientes	99.7	X	Y	Z	AA	AB			
-Día 7*-Atenuación Natural	97.5	X	Y	Z	AA	AB			
-Día 1*-C2- Sin aplicación de nutrientes	96.8	X	Y	Z	AA	AB			
-Día 5*-Sin inóculo + Glucosa 2%	85.1	Y	Z	AA	AB	AC			



## Adición de concentraciones crecientes de Nitrato de amonio (Bioestimulación) al suelo contaminado inoculado con C1

Análisis de varianza (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	84	1871984.566	22285.531	149.077	< <b>0.0001</b>
Error	170	25413.227	149.490		
Total corregido	254	1897397.792			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Días	16	1081730.662	67608.166	452.260	< <b>0.0001</b>
Tratamiento	4	101379.893	25344.973	169.543	< <b>0.0001</b>
Días*Tratamiento	64	688874.011	10763.656	72.003	< <b>0.0001</b>

**Días\*Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (mg/CO<sub>2</sub>):**

Categoría	Me	LS	Grupos			
-Día 18*-C1- Sin aplicación de nutrientes	512.6	A				
-Día 5*-C1- Sin aplicación de nutrientes	316.8	B				
-Día 9*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	284.5	C				
-Día 9*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	278.7	C				
-Día 9*-C1- Sin aplicación de nutrientes	266.9	C				
-Día 3*-C1- Sin aplicación de nutrientes	245.7	D				
-Día 3*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	228.1	D	E			
-Día 3*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	226.6	D	E			
-Día 9*-Atenuación Natural	209.7	E	F			
-Día 8*-C1- Sin aplicación de nutrientes	200.2	F	G			
-Día 8*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	187.0	G	H			
-Día 8*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	185.5	G	H	I		
-Día 9*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	180.4	H	I			
-Día 3*-Atenuación Natural	179.7	H	I	J		
-Día 2*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	166.5	I	J	K		
-Día 3*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	160.6	J	K			
-Día 7*-C1- Sin aplicación de nutrientes	154.7	K	L			
-Día 8*-Atenuación Natural	150.3	K	L			
-Día 2*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	138.6	L	M			
-Día 2*-Atenuación Natural	137.1	L	M			
-Día 2*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	128.3	M	N			
-Día 7*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	128.3	M	N			
-Día 7*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	128.3	M	N			
-Día 6*-Atenuación Natural	124.7	M	N	O		
-Día 4*-Atenuación Natural	115.1	N	O	P		
-Día 2*-C1- Sin aplicación de nutrientes	107.8	O	P	Q		
-Día 16*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	107.1	O	P	Q	R	
-Día 8*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	106.3	O	P	Q	R	
-Día 6*-C1+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	104.1	P	Q	R		
-Día 6*-C1+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	102.7	P	Q	R	S	
-Día 7*-Atenuación Natural	97.5	P	Q	R	S	T

-Día 1*-C1- Sin aplicación de nutrientes	96.8	P	Q	R	S	T	U		
-Día 7*-C1+ NH4NO3 2%	96.1	P	Q	R	S	T	U		
-Día 4*-C1- Sin aplicación de nutrientes	94.6	Q	R	S	T	U	V		
-Día 4*-C1+NH4NO3 0.05%	94.6	Q	R	S	T	U	V		
-Día 6*-C1+ NH4NO3 2%	88.0	R	S	T	U	V	W		
-Día 16*-C1+ NH4NO3 2%	83.6	S	T	U	V	W	X		
-Día 4*-C1+ NH4NO3 2%	82.9	T	U	V	W	X			
-Día 4*-C1+ NH4NO3 1%	79.9	T	U	V	W	X			
-Día 5*-Atenuación Natural	77.7	U	V	W	X	Y			
-Día 16*-C1- Sin aplicación de nutrientes	76.3	V	W	X	Y				
-Día 16*-C1+ NH4NO3 1%	74.8	W	X	Y					
-Día 16*-Atenuación Natural	71.9	W	X	Y	Z				
-Día 18*-C1+NH4NO3 0.05%	64.5	X	Y	Z	AA				
-Día 1*-C1+ NH4NO3 1%	64.5	X	Y	Z	AA				
-Día 5*-C1+NH4NO3 0.05%	58.7	Y	Z	AA	AB				
-Día 18*-Atenuación Natural	53.5	Z	AA	AB	AC				
-Día 1*-C1+NH4NO3 0.05%	52.8	Z	AA	AB	AC				
-Día 22*-Atenuación Natural	52.1	AA	AB	AC					
-Día 13*-C1+NH4NO3 0.05%	51.3	AA	AB	AC					
-Día 20*-C1+NH4NO3 0.05%	50.6	AA	AB	AC					
-Día 5*-C1+ NH4NO3 1%	48.4	AA	AB	AC	AD				
-Día 22*-C1+NH4NO3 0.05%	48.4	AA	AB	AC	AD				
-Día 18*-C1+ NH4NO3 2%	46.2	AA	AB	AC	AD	AE			
-Día 25*-C1+NH4NO3 0.05%	43.3	AB	AC	AD	AE	AF			
-Día 22*-C1- Sin aplicación de nutrientes	41.8	AB	AC	AD	AE	AF			
-Día 18*-C1+ NH4NO3 1%	41.8	AB	AC	AD	AE	AF			
-Día 5*-C1+ NH4NO3 2%	41.1	AB	AC	AD	AE	AF	AG		
-Día 1*-Atenuación Natural	39.6	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	
-Día 25*-C1+ NH4NO3 1%	39.6	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	
-Día 25*-Atenuación Natural	39.6	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	
-Día 1*-C1+ NH4NO3 2%	39.6	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	
-Día 22*-C1+ NH4NO3 1%	38.1	AC	AD	AE	AF	AG	AH		
-Día 22*-C1+ NH4NO3 2%	37.4	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	
-Día 20*-C1- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
-Día 25*-C1- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
-Día 25*-C1+ NH4NO3 2%	35.2	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
-Día 20*-Atenuación Natural	34.5	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
-Día 13*-C1+ NH4NO3 2%	29.3	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK
-Día 23*-C1+NH4NO3 0.05%	27.9	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL
-Día 24*-C1+NH4NO3 0.05%	27.5	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL
-Día 13*-C1- Sin aplicación de nutrientes	24.9	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM
-Día 23*-C1- Sin aplicación de nutrientes	24.9	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM
-Día 20*-C1+ NH4NO3 2%	24.9	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM
-Día 13*-C1+ NH4NO3 1%	24.9	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM
-Día 24*-C1- Sin aplicación de nutrientes	21.6	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	
-Día 23*-Atenuación Natural	20.5	AH	AI	AJ	AK	AL	AM		
-Día 13*-Atenuación Natural	20.5	AH	AI	AJ	AK	AL	AM		
-Día 20*-C1+ NH4NO3 1%	18.3	AI	AJ	AK	AL	AM			
-Día 24*-Atenuación Natural	18.0	AI	AJ	AK	AL	AM			
-Día 24*-C1+ NH4NO3 1%	16.5	AJ	AK	AL	AM				
-Día 23*-C1+ NH4NO3 2%	10.3	AK	AL	AM					
-Día 23*-C1+ NH4NO3 1%	8.8	AL	AM						
-Día 24*-C1+ NH4NO3 2%	8.4	AL	AM						
-Día 6*-C1- Sin aplicación de nutrientes	5.9	AM							

## Adición de concentraciones crecientes de Nitrato de amonio (Bioestimulación) al suelo contaminado inoculado con C2

Análisis de varianza (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	84	1745794.757	20783.271	242.200	< 0.0001
Error	170	14587.760	85.810		
Total corregido	254	1760382.517			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Días	16	1094744.416	68421.526	797.357	< 0.0001
Tratamiento	4	94045.300	23511.325	273.992	< 0.0001
Días*Tratamiento	64	557005.042	8703.204	101.424	< 0.0001

**Días\*Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (mg/CO<sub>2</sub>):**

Categoría	Media	Grupos			
-Día 18*-C2- Sin aplicación de nutrientes	539.0	A			
-Día 9*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	281.6	B			
-Día 9*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	274.3	B			
-Día 9*-C2- Sin aplicación de nutrientes	253.7	C			
-Día 3*-C2- Sin aplicación de nutrientes	245.7	C	D		
-Día 9*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	234.7	D			
-Día 3*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	211.9	E			
-Día 9*-Atenuación Natural	209.7	E			
-Día 8*-C2- Sin aplicación de nutrientes	207.5	E			
-Día 3*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	206.1	E			
-Día 3*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	197.3	E	F		
-Día 8*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	184.1	F	G		
-Día 7*-C2- Sin aplicación de nutrientes	182.6	F	G		
-Día 3*-Atenuación Natural	179.7	G	H		
-Día 8*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	166.5	H	I		
-Día 8*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	159.1	I	J		
-Día 8*-Atenuación Natural	150.3	J	K		
-Día 7*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	141.5	K	L		
-Día 2*-Atenuación Natural	137.1	K	L	M	
-Día 2*-C2- Sin aplicación de nutrientes	134.2	L	M		
-Día 4*-C2- Sin aplicación de nutrientes	132.7	L	M		
-Día 7*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	132.7	L	M		
-Día 6*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	132.0	L	M	N	
-Día 2*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	126.9	L	M	N	O
-Día 7*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	125.4	M	N	O	
-Día 6*-Atenuación Natural	124.7	M	N	O	
-Día 16*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	117.3	N	O	P	
-Día 4*-Atenuación Natural	115.1	O	P	Q	
-Día 16*-C2- Sin aplicación de nutrientes	104.1	P	Q	R	
-Día 4*-C2+ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	103.4	P	Q	R	



## Adición de concentraciones crecientes de Glucosa y Nitrato de amonio (Bioestimulación) al suelo contaminado inoculado con C1

Análisis de varianza (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	84	22325671.783	265781.807	1609.167	< <b>0.0001</b>
Error	170	28078.453	165.167		
Total corregido	254	22353750.236			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Días	16	4502410.019	281400.626	1703.730	< <b>0.0001</b>
Tratamiento	4	4919170.850	1229792.713	7445.736	< <b>0.0001</b>
Días*Tratamiento	64	12904090.914	201626.421	1220.740	< <b>0.0001</b>

**Días\*Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (mg/CO<sub>2</sub>):**

Categoría	Me LS	Grupos	
-Día 20*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	1211.5	A	
-Día 24*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	1204.1	A	
-Día 23*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	1199.7	A	
-Día 24*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	1192.4	A	
-Día 23*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	1102.9	B	
-Día 22*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	1064.8	C	
-Día 20*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	888.8	D	
-Día 18*-C1- Sin aplicación de nutrientes	512.6	E	
-Día 18*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	451.0	F	
-Día 16*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	412.1	G	
-Día 16*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	407.7	G	
-Día 4*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	405.5	G	
-Día 9*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	324.1	H	
-Día 5*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	316.8	H	
-Día 5*-C1- Sin aplicación de nutrientes	316.8	H	
-Día 2*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	307.3	H	
-Día 2*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	304.3	H	
-Día 9*-C1- Sin aplicación de nutrientes	266.9	I	
-Día 6*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	259.6	I	J
-Día 3*-C1- Sin aplicación de nutrientes	245.7	J	K
-Día 3*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	235.4	K	
-Día 4*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	235.4	K	
-Día 9*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	212.7	L	
-Día 9*-Atenuación Natural	209.7	L	
-Día 3*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	207.5	L	
-Día 5*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	206.8	L	
-Día 8*-C1- Sin aplicación de nutrientes	200.2	L	M
-Día 9*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	195.1	L	M
-Día 8*-C1+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	194.3	L	M
-Día 3*-Atenuación Natural	179.7	M	N

-Día 6*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	165.7	N	O						
-Día 8*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	159.1	N	O						
-Día 7*-C1- Sin aplicación de nutrientes	154.7	O	P						
-Día 8*-Atenuación Natural	150.3	O	P	Q					
-Día 7*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	147.4	O	P	Q					
-Día 2*-Atenuación Natural	137.1	P	Q	R					
-Día 16*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	133.5	Q	R	S					
-Día 6*-Atenuación Natural	124.7	R	S	T					
-Día 7*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	123.9	R	S	T					
-Día 2*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	121.0	R	S	T					
-Día 4*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	116.6	R	S	T	U				
-Día 4*-Atenuación Natural	115.1	S	T	U	V				
-Día 6*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	111.5	T	U	V					
-Día 2*-C1- Sin aplicación de nutrientes	107.8	T	U	V					
-Día 1*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	99.7	U	V	W					
-Día 7*-Atenuación Natural	97.5	U	V	W	X				
-Día 1*-C1- Sin aplicación de nutrientes	96.8	U	V	W	X				
-Día 4*-C1- Sin aplicación de nutrientes	94.6	V	W	X	Y				
-Día 1*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	83.6	W	X	Y	Z				
-Día 1*-C1+ Glucosa y NH4NO3 1%	82.1	W	X	Y	Z				
-Día 5*-Atenuación Natural	77.7	X	Y	Z					
-Día 16*-C1- Sin aplicación de nutrientes	76.3	Y	Z						
-Día 8*-C1+ Glucosa y NH4NO3 1%	72.6	Z	AA						
-Día 16*-Atenuación Natural	71.9	Z	AA						
-Día 3*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	69.7	Z	AA						
-Día 5*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	67.5	Z	AA	AB					
-Día 18*-Atenuación Natural	53.5	AA	AB	AC					
-Día 13*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	52.8	AA	AB	AC	AD				
-Día 22*-Atenuación Natural	52.1	AA	AB	AC	AD				
-Día 18*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	48.4	AB	AC	AD					
-Día 22*-C1+ Glucosa y NH4NO3 1%	43.3	AC	AD	AE					
-Día 22*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	42.5	AC	AD	AE					
-Día 25*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	42.5	AC	AD	AE					
-Día 18*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	41.8	AC	AD	AE	AF				
-Día 22*-C1- Sin aplicación de nutrientes	41.8	AC	AD	AE	AF				
-Día 25*-C1+ Glucosa y NH4NO3 2%	41.1	AC	AD	AE	AF	AG			
-Día 25*-C1+ Glucosa y NH4NO3 1%	40.3	AC	AD	AE	AF	AG			
-Día 25*-Atenuación Natural	39.6	AC	AD	AE	AF	AG			
-Día 1*-Atenuación Natural	39.6	AC	AD	AE	AF	AG			
-Día 7*-C1+ Glucosa y NH4NO3 1%	38.9	AC	AD	AE	AF	AG			
-Día 20*-C1- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AC	AD	AE	AF	AG	AH		
-Día 25*-C1- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AC	AD	AE	AF	AG	AH		
-Día 20*-Atenuación Natural	34.5	AC	AD	AE	AF	AG	AH		
-Día 13*-C1+ Glucosa y NH4NO3 1%	32.3	AD	AE	AF	AG	AH			
-Día 13*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	26.4	AE	AF	AG	AH	AI			
-Día 13*-C1- Sin aplicación de nutrientes	24.9	AE	AF	AG	AH	AI			
-Día 23*-C1- Sin aplicación de nutrientes	24.9	AE	AF	AG	AH	AI			
-Día 20*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	23.5	AE	AF	AG	AH	AI			
-Día 24*-C1- Sin aplicación de nutrientes	21.6	AF	AG	AH	AI				
-Día 23*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	21.3	AF	AG	AH	AI				
-Día 13*-Atenuación Natural	20.5	AG	AH	AI					
-Día 23*-Atenuación Natural	20.5	AG	AH	AI					
-Día 24*-Atenuación Natural	18.0	AH	AI						
-Día 24*-C1+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	17.2	AH	AI						
-Día 6*-C1- Sin aplicación de nutrientes	5.9	AI							

## Adición de concentraciones crecientes de Glucosa y Nitrato de amonio (Bioestimulación) al suelo contaminado inoculado con C2

Análisis de varianza (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	84	19785425.039	235540.774	882.561	< 0.0001
Error	170	45370.160	266.883		
Total corregido	254	19830795.199			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (mg/CO<sub>2</sub>):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Días	16	4000469.259	250029.329	936.849	< 0.0001
Tratamiento	4	5177070.934	1294267.733	4849.564	< 0.0001
Días*Tratamiento	64	10607884.846	165748.201	621.051	< 0.0001

**Días\*Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (mg/CO<sub>2</sub>):**

Categoría	Media	Grupos		
-Día 24*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	1177.7	A		
-Día 23*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	1155.7	A		
-Día 24*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	1116.1	B		
-Día 20*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	1076.5	C		
-Día 23*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	1073.6	C		
-Día 20*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	973.9	D		
-Día 22*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	830.1	E		
-Día 18*-C2- Sin aplicación de nutrientes	539.0	F		
-Día 16*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	418.0	G		
-Día 4*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	405.5	G	H	
-Día 9*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	403.3	G	H	
-Día 16*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	387.2	H	I	
-Día 8*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	380.6	H	I	
-Día 18*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	363.0	I	J	
-Día 7*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	341.0	J	K	
-Día 5*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	316.8	K	L	
-Día 9*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	312.4	L		
-Día 2*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	307.3	L	M	
-Día 6*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	306.5	L	M	
-Día 4*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	304.3	L	M	
-Día 9*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	286.0	M	N	
-Día 2*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	273.5	N	O	
-Día 5*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	265.5	N	O	P
-Día 9*-C2- Sin aplicación de nutrientes	253.7	O	P	Q
-Día 3*-C2- Sin aplicación de nutrientes	245.7	P	Q	
-Día 8*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1%	228.1	Q	R	
-Día 3*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.05%	213.4	R	S	
-Día 6*-C2+ Glucosa y NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2%	209.7	R	S	T
-Día 9*-Atenuación Natural	209.7	R	S	T

-Día 8*-C2- Sin aplicación de nutrientes	207.5	R	S	T	U				
-Día 7*-C2+ Glucosa y NH4NO3 1%	192.9	S	T	U	V				
-Día 8*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	184.1	T	U	V					
-Día 7*-C2- Sin aplicación de nutrientes	182.6	U	V						
-Día 3*-Atenuación Natural	179.7	V							
-Día 8*-Atenuación Natural	150.3	W							
-Día 7*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	140.1	W	X						
-Día 2*-Atenuación Natural	137.1	W	X						
-Día 2*-C2- Sin aplicación de nutrientes	134.2	W	X	Y					
-Día 1*-C2+ Glucosa y NH4NO3 1%	133.5	W	X	Y					
-Día 4*-C2- Sin aplicación de nutrientes	132.7	W	X	Y					
-Día 16*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	132.0	W	X	Y					
-Día 2*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	129.8	W	X	Y	Z				
-Día 6*-Atenuación Natural	124.7	W	X	Y	Z	AA			
-Día 4*-Atenuación Natural	115.1	X	Y	Z	AA	AB			
-Día 4*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	109.3	Y	Z	AA	AB				
-Día 16*-C2- Sin aplicación de nutrientes	104.1	Z	AA	AB					
-Día 6*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	101.2	AA	AB	AC					
-Día 5*-C2- Sin aplicación de nutrientes	99.7	AA	AB	AC	AD				
-Día 1*-C2+ Glucosa y NH4NO3 2%	99.7	AA	AB	AC	AD				
-Día 7*-Atenuación Natural	97.5	AB	AC	AD	AE				
-Día 1*-C2- Sin aplicación de nutrientes	96.8	AB	AC	AD	AE				
-Día 1*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	89.5	AB	AC	AD	AE				
-Día 5*-Atenuación Natural	77.7	AC	AD	AE	AF				
-Día 3*-C2+ Glucosa y NH4NO3 2%	74.1	AD	AE	AF	AG				
-Día 16*-Atenuación Natural	71.9	AE	AF	AG	AH				
-Día 22*-C2+ Glucosa y NH4NO3 1%	63.1	AF	AG	AH	AI				
-Día 5*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	63.1	AF	AG	AH	AI				
-Día 25*-C2+ Glucosa y NH4NO3 2%	61.6	AF	AG	AH	AI				
-Día 20*-C2- Sin aplicación de nutrientes	60.1	AF	AG	AH	AI	AJ			
-Día 13*-C2- Sin aplicación de nutrientes	58.7	AF	AG	AH	AI	AJ	AK		
-Día 25*-C2- Sin aplicación de nutrientes	57.9	AF	AG	AH	AI	AJ	AK		
-Día 25*-C2+ Glucosa y NH4NO3 1%	55.7	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	
-Día 25*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	55.0	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	
-Día 18*-Atenuación Natural	53.5	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	
-Día 22*-Atenuación Natural	52.1	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	
-Día 22*-C2- Sin aplicación de nutrientes	50.6	AG	AH	AI	AJ	AK	AL		
-Día 18*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	49.9	AG	AH	AI	AJ	AK	AL		
-Día 20*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	46.2	AH	AI	AJ	AK	AL	AM		
-Día 22*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	44.7	AI	AJ	AK	AL	AM			
-Día 18*-C2+ Glucosa y NH4NO3 2%	44.0	AI	AJ	AK	AL	AM	AN		
-Día 1*-Atenuación Natural	39.6	AI	AJ	AK	AL	AM	AN		
-Día 25*-Atenuación Natural	39.6	AI	AJ	AK	AL	AM	AN		
-Día 6*-C2- Sin aplicación de nutrientes	35.2	AJ	AK	AL	AM	AN	AO		
-Día 20*-Atenuación Natural	34.5	AJ	AK	AL	AM	AN	AO		
-Día 13*-C2+ Glucosa y NH4NO3 1%	33.7	AK	AL	AM	AN	AO			
-Día 13*-C2+ Glucosa y NH4NO3 2%	33.7	AK	AL	AM	AN	AO			
-Día 23*-C2- Sin aplicación de nutrientes	31.5	AL	AM	AN	AO				
-Día 13*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	23.5	AM	AN	AO					
-Día 24*-C2- Sin aplicación de nutrientes	22.4	AM	AN	AO					
-Día 13*-Atenuación Natural	20.5	AM	AN	AO					
-Día 23*-Atenuación Natural	20.5	AM	AN	AO					
-Día 23*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	18.3	AN	AO						
-Día 24*-Atenuación Natural	18.0	AN	AO						
-Día 24*-C2+ Glucosa y NH4NO3 0.05%	12.8	AO	AP						
-Día 3*-C2+ Glucosa y NH4NO3 1%	12.5	AP							

## Anexo 5. Análisis estadísticos de la Cuantificación de HTP's

### Bioestimulación del C1 y C2 su efecto en la degradación de HTP's del suelo contaminado

Análisis de varianza (HTP's):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	23	1560524545.024	67848893.262	7.205	< <b>0.0001</b>
Error	48	452026521.694	9417219.202		
Total corregido	71	2012551066.717			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

Análisis Suma de Cuadrados Tipo I (TPHS):

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Tratamiento	23	1560524545.024	67848893.262	7.205	< <b>0.0001</b>

### Tratamiento / Fisher (LSD) / Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (HTP's)

Categoría	Media	Grupos					
C2GA 1%	25206.2	A					
C2GA 0.05%	24948.1	A					
C1G 0.05%	24792.4	A	B				
C1GA 1%	24632.4	A	B	C			
C2A 2%	24252.9	A	B	C	D		
C1G1%	24131.1	A	B	C	D	E	
C1G 2%	23790.4	A	B	C	D	E	F
Suelo Contaminado	22942.0	A	B	C	D	E	F
Atenuación Natural	22918.2	A	B	C	D	E	F
C1A 0.05%	22455.7	A	B	C	D	E	F
C1-Sin aplicación de nutrientes	22320.4	A	B	C	D	E	F
C2G 0.05%	21530.2	A	B	C	D	E	F
C2G 2%	21220.3	A	B	C	D	E	F
C2GA 2%	21019.2	A	B	C	D	E	F
C2-Sin aplicación de nutrientes	20914.7	A	B	C	D	E	F
C2A 1%	20665.4	A	B	C	D	E	F
C1GA 2%	19908.3		B	C	D	E	F
C1A 2%	19867.8		B	C	D	E	F
C1GA 0.05%	19711.9			C	D	E	F
C2G 1%	19375.2				D	E	F
Sin inóculo + G 2%	19147.8					E	F
C2A 0.05%	18769.0						F
C1A 1%	17667.5						G
Suelo Testigo	1172.9						